

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Tereza Kratochvílová

Role makrofágů v interakci leishmanie - flebotomus - hostitel

Macrophages in leishmania – sand fly – host interactions

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Iva Kolářová, Ph. D.

Praha 2012

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 27. 8. 2012

Tereza Kratochvílová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Ivě Kolářové, která mi byla oporou během celého bakalářského a magisterského studia. Děkuji jí za trpělivost, za seznámení s daným tématem a také podporu a asistování při časově náročných experimentech. Honzovi Votýpkovi děkuji za pomoc v rámci kvantitativní PCR. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu naší laboratoře za vytváření přátelské atmosféry, jmenovitě pak Vítkovi Dvořákovi, Míše Vlkové a Kačce Kvapilové, bez jejichž humoru a optimismu bych jen těžko ve zdraví přežila psaní této práce. V neposlední řadě patří moje velké poděkování rodičům a příteli Michalovi za podporu během celého studia na Univerzitě Karlově v Praze.

Seznam zkratek:

AMP	adenosinmonofosfát
APC	buňka prezentující antigen (antigen-presenting cell)
DTH	přecitlivělost oddáleného typu (delayed type hypersensitivity)
fPPG	filamentózní proteofosfoglykan
GIPL	glykoinositol fosfolipid
gp	glykoprotein
IFN- γ	interferon gama
Ig	imunoglobulin
IL	interleukin
iNOS	inducibilní NO syntáza
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LPG	lipofosfoglykan
LPS	lipopolysacharid
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
NADPH	redukováná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu
NO	oxid dusnatý
NK	přirození zabíječi (natural killers)
<i>P.</i>	<i>Phlebotomus</i>
PSG	promastigoty produkovaný sekret (promastigote secretory gel)
RNI	radikály dusíku (reactive nitrogen intermediates)
ROI	radikály kyslíku (reactive oxygen intermediates)
TGF- β	transformující růstový faktor beta (transforming growth factor)
Th	pomocné T lymfocyty (helper T lymphocyte)
TNF- α	faktor nekrotizující nádory alfa (tumor necrosis factor)

ABSTRAKT

Flebotomové (řád: Diptera) jsou významnými přenašeči parazitických prvků rodu *Leishmania* (řád: Trypanosomatida), kteří jsou do hostitele inokulováni společně se slinami vektora. Právě sliny flebotomů mají významnou roli v přenosu leishmaniózy – u naivního hostitele suprimují jeho imunitní systém a umožňují tak vývoj leishmaniové infekce, zatímco opakovaně pobodaní hostitelé jsou proti infekci chráněni.

Předložená diplomová práce se zabývá především vlivem slin flebotomů na buněčnou složku imunity hostitelů se zaměřením na makrofágy, které jsou klíčové v obraně proti leishmanióze. V první části diplomové práce jsme si zavedli myší model *L. major* – *P. papatasi* – Balb/c, na kterém jsme ověřili ochranný efekt imunizace slinami *P. papatasi* na vývoj leishmaniové infekce. Imunizované myši byly chráněny proti leishmaniím, což se odrazilo na velikosti léze, počtu leishmanií v uchu i spádové uzlině a také na produkovaných cytokinech. Makrofágy z imunizovaných myší však produkovaly méně oxidu dusnatého, zatímco arginázová aktivita byla srovnatelná s neimunizovanou skupinou. Indikátorem kontaktu hostitele s flebotomy nám byly naměřené IgG protilátky proti složkám slin, zatímco IgG protilátky proti leishmaniím sloužily jako ukazatel rozvoje infekce způsobené *L. major*.

Další část experimentů byla věnována prověření možnosti zkřížené protekce BALB/c myši proti *L. major* mezi blízkce příbuznými druhy flebotomů – *P. papatasi* a *P. duboscqi*. Zkřížená protekce se u imunizované skupiny potvrdila prostřednictvím menšího rozměru léze, nižšího počtu leishmanií v uzlině při porovnání se skupinou kontrolní. Produkce cytokinů i produkce oxidu dusnatého však zůstala srovnatelná.

Druhá část diplomové práce byla zaměřena na testování vlivu slinných žláz vybraných druhů flebotomů, leishmanií či obou faktorů na aktivitu linií makrofágů získaných jak z kmene myši citlivých k leishmanióze (Balb/c), tak z rezistentních myší (C57BL/6). Slinné žlázy všech testovaných druhů flebotomů účinně inhibovaly produkci oxidu dusnatého. K vyššímu stupni inhibice docházelo po přidání samotných promastigotů nebo v kombinaci s ¼ slinné žlázy. Naopak přidání promastigotů v kombinaci s ½ slinné žlázy inhibiční efekt rušilo. Jelikož se jednalo o buňky aktivované klasickou cestou (kombinací IFN- γ a LPS), arginázová aktivita neboli alternativní směr aktivace byl minimální.

Klíčová slova: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, sliny, leishmanie, makrofágy, cytokiny, oxid dusnatý, argináza

ABSTRACT

Sand flies (order Diptera) are vectors of *Leishmania* parasites (Trypanosomatida), which are inoculated into the host skin together with the vector saliva. Sand fly saliva plays the important role in the *Leishmania* transmission; in naive host it suppresses the host immune response assisting *Leishmania* to establish the infection, while in repeatedly bitten host it elicits a protective immune response.

The submitted thesis focuses on the effect of sand fly saliva on macrophages, the key cells in the infection control. In the first part of the thesis we established a laboratory model *L. major* – *P. papatasi* – Balb/c to describe the protective effect of saliva immunization on *Leishmania* infection development. Immunized mice were protected against *Leishmania* infection which was reflected in the ear lesion size, parasite load in the ear dermis and draining lymph nodes but also in cytokine production. On the contrary, produced lower amount of nitric oxide, while arginase activity was comparable with nonimmunized group. The IgG antibodies against saliva served as a marker of exposure to sandflies while IgG antibodies against *Leishmania* antigens served as a marker of infection severity.

The experiments were aimed on the possibility of cross-protectivity in Balb/c mice against *L. major* between closely related species *P. papatasi* and *P. duboscqi*. The cross protection was confirmed in a group of immunized mice by significantly smaller ear lesion size and reduced parasite load in the draining lymph node as compared to the control group. However, the production of cytokines and nitric oxide remain comparable between the groups.

The second part of this thesis was focused on the effect of sand fly saliva, *Leishmania* or both factors on the macrophages from mice sensitive (Balb/c) or resistant (C57BL/6) to *Leishmania* infection. Our results indicate that salivary gland homogenate downregulates nitric oxide production. The strong inhibitory effect occurred with promastigotes or promastigotes with 1/4 salivary gland. Conversely, inhibitory effect was neutralized when macrophages were incubated with promastigotes and 1/2 salivary. Since the macrophages were activated via classical pathway (with a combination of IFN- γ and LPS) the production of urea as a marker of alternative activation was mostly comparable to controls.

Key words: *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, saliva, *Leishmania*, macrophages, cytokines, nitric oxide, arginase

Obsah

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1 Leishmanióza	11
2.2 Imunitní odpověď hostitele namířená proti leishmaniím	12
2.2.1 Neutrofily a jejich úloha při leishmanióze	13
2.2.2 Makrofágy a jejich úloha při leishmanióze	14
2.2.3 Cytokinové prostředí a jeho úloha při leishmanióze	17
2.3 Povrchové molekuly leishmanií a jejich vliv na rozvoj infekce	19
2.4 Další molekuly leishmanií ovlivňující vývoj infekce	20
2.5 Molekuly slinných žláz flebotomů a jejich vliv na rozvoj infekce	22
3. MATERIÁL A METODIKA	26
3.1 Flebotomové	26
3.1.1 Chov flebotomů	26
3.1.2 Pitva slinných žláz	27
3.2 Leishmanie	28
3.2.1 Vymrazení leishmanií a přeočkování	28
3.2.2 Promývání a počítání leishmanií	28
3.3 Pokusy na myším modelu	29
3.3.1 Imunizace	29
3.3.2 Infekce	29
3.3.3 Usmrcení myši a shromáždění vzorků	30
3.4 Aktivita makrofágů	30
3.4.1 NO – Griessova reakce	31
3.4.2 Arginázová aktivita	32
3.4.3 Stanovení protilátek a cytokinů	33
3.5 Izolace DNA a kvantifikace leishmanií	36

3.5.1 Izolace DNA	36
3.5.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	36
3.6 Pokusy na makrofágových liniích.....	37
3.6.1 Vymražení makrofágů a kultivace.....	37
3.6.2 Aktivita makrofágů.....	38
3.7 Statistické vyhodnocení	38
4. VÝSLEDKY	40
EXPERIMENTY NA MYŠÍM MODELU	40
4.1 Vývoj infekce <i>Leishmania major</i>	40
4.1.1 Vývoj leishmaniové léze	40
4.1.2 Kvantifikace leishmanií v orgánech /tkáních myši Balb/c	41
4.1.3 Protilátková odpověď myši Balb/c proti <i>L. major</i>	43
4.2 Aktivita makrofágů	44
4.2.1 Produkce NO	44
4.2.2 Produkce močoviny	46
4.2.3 Stanovení cytokinů	47
4.3 Protilátková odpověď myši Balb/c proti slinám <i>P. papatasi</i> a <i>P. duboscqi</i>	51
EXPERIMENTY NA MAKROFÁGOVÝCH LINIÍCH	54
4.4 Vliv slinných žláz přenašečů <i>L. major</i> na aktivitu makrofágů.....	54
4.4.1 Produkce NO	54
4.4.2 Produkce močoviny	56
4.5 Vliv slinných žláz přenašečů <i>L. infantum</i> na aktivitu makrofágů	57
4.5.1 Produkce NO	57
4.5.2 Produkce močoviny	59
5. DISKUZE	62
6. ZÁVĚREČNÉ SHRnutí	69
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	71

1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Leishmanióza, onemocnění vyskytující se na území 4 kontinentů, 98 zemí, postihuje téměř 12 milionů lidí a řadí se dle Světové zdravotnické organizace mezi 10 nejvýznamnějších a nejrozšířenějších infekčních chorob světa. Leishmanie, jednobuněční původci tohoto onemocnění jsou přenášeny dvoukřídlým krevsajícím hmyzem čeledi Phlebotominae (Gomes and Oliveira, 2012; WHO).

Úspěšnost leishmanií je mimo jiné spojena se schopností manipulovat svým vektorem, či imunitním systémem hostitele ve svůj prospěch. K ovlivnění imunitní odpovědi hostitele dochází nejenom prostřednictvím povrchových molekul či produktů parazita, ale svou roli hrají také sliny vektora, jež jsou společně s leishmaniami inokulovány do rány. Složky slinných žláz obsahují vedle molekul usnadňujících sání hematofága také imunomodulační složky, které hrají významnou roli při přenosu leishmanií. Jsou schopné zvyšovat virulenci leishmanií v případě, pokud v minulosti nedošlo ke kontaktu hostitele s vektorem. Tato schopnost slin byla v anglické literatuře pojmenována jako tzv. „enhancing effect“ (Gomes and Oliveira, 2012; Rohousova and Volf, 2006).

Jelikož se prokázalo, že hostitel imunizovaný slinnými žlázami flebotoma je schopen neutralizovat výše popsany „enhancing effect“ slin uplatňující se u naivního hostitele (Belkaid *et al.*, 1998; Kamhawi *et al.*, 2000), začalo se uvažovat o tvorbě vakcíny namířené proti slinným žlázám flebotomů či jejich jednotlivým složkám. Vakcinace myši maxadilanem, silným vasodilatátorem, který se vyskytuje ve slinách flebotoma druhu *Lutzomyia longipalpis*, chránila tohoto hostitele před infekcí *L. major*. Infekce v přítomnosti slin *Lu. longipalpis* vyvolala u myši specifickou imunitní odpověď, která byla detekována prostřednictvím paměťových CD4⁺ T lymfocytů a také přítomností protilátek namířených proti této složce slin (Morris *et al.*, 2001). Úspěšně otestovány byly i další komponenty slinných žláz flebotomů vyvolávající v hostitelích protektivní efekt proti kožní i viscerální leishmanióze (da Silva *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2011; Valenzuela *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2011).

Využití těchto vakcín je však omezeno, jelikož komponenty slinných žláz se liší mezi jednotlivými druhy flebotomů (Ribeiro *et al.*, 2010; Volf *et al.*, 2000) a proto vakcína chránící hostitele imunizovaného slinami jednoho druhu flebotoma nemusí chránit hostitele při přenosu infekce jiným, například sympatricky se vyskytujícím druhem flebotoma. Pouze u druhů fylogeneticky příbuzných by mohlo být složení slin více konzervativní, čehož by se dalo využít při vývoji vakcíny použitelné pak pro více endemických ohnisek. Existence

zkřížené protekce proti *L. braziliensis* byla nedávno popsána mezi blízce příbuznými druhy *Lu. longipalpis* a *Lu. intermedia* (Tavares *et al.*, 2011).

V návaznosti na výše popsané poznatky bylo hlavním cílem této diplomové práce prověřit možnost zkřížené protekce u Balb/c myši infikovaných *L. major*, kterou v přírodě přenáší blízce příbuzné druhy *P. papatasi* a *P. duboscqi*. Zároveň jsme chtěli prověřit již dříve popsaný jev protektivního efektu u exponovaných myši sání *P. papatasi*, infikovaných *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz stejného druhu flebotoma (Kamhawi *et al.*, 2000). Druhá část práce je věnovaná efektu slinných žláz vybraných druhů flebotomů na aktivitu makrofágových linií.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Leishmanióza

Leishmanióza je onemocnění způsobené parazitickými prvky rodu *Leishmania*. Přenos těchto prvků je zprostředkován pomocí hematofágního dvoukřídleho hmyzu čeledi Phlebotominae. V Novém Světě se na něm podílí flebotomové rodu *Lutzomyia*, ve Starém světě rodu *Phlebotomus* (Pavli and Maltezou, 2010).

Leishmanie se vyskytují ve dvou základních formách, amastigotech a promastigotech. Amastigoty nacházíme uvnitř fagocytyjících buněk obratlovčího hostitele (intracelulární forma), zatímco promastigoty v zaživacím traktu flebotoma (extracelulární forma). Tyto dvě formy se dají jednoduše rozlišit na základě morfologie – zatímco u amastigotů není patrný bičík, součástí promastigotů je dobře viditelný bičík, pomocí něhož se leishmanie pohybují v zaživacím traktu vektora (Sharma and Singh, 2008; Van Assche *et al.*, 2011).

Periferní krev nakaženého hostitele obsahuje makrofágy s pohlcenými amastigoty. Při sání krve z takto nakaženého hostitele dochází k nákaze samice flebotoma. V jeho střevě se leishmanie uvolňují z makrofágů, mění se na procyklické promastigoty a vyvíjejí se dále až do stádia tzv. metacyklických promastigotů, kteří jsou infekční pro dalšího obratlovčího hostitele (Sharma and Singh, 2008; Van Assche *et al.*, 2011). Metacyklické promastigoti inokulovaní do savčího hostitele jsou schopni invadovat několik typů fagocytózy schopných buněk, ale nejčastěji jsou fagocytováni přímo makrofágy nebo zprostředkovaně přes neutrofily (Sharma and Singh, 2008; Van Assche *et al.*, 2011).

Leishmanióza se projevuje ve třech základních klinických formách: kožní, kožně-slizniční a viscerální. Vedle kmene leishmanie rozhoduje o výsledných symptomech také např. genetická predispozice a imunitní stav hostitele (Antinori *et al.*, 2012). Kožní leishmaniózu způsobují především druhy *Leishmania tropica*, *L. major* ve Starém Světě a *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* v Novém Světě. Kožní leishmanióza může dosáhnout několika klinických projevů – od ulcerativní kožní léze po destruktivní mukózní zánět označovaný jako kožně-slizniční forma. Viscerální leishmaniózu, která je v případě absence léčení smrtelná, způsobuje komplex *Leishmania donovani* zahrnující druhy *L. donovani* a *L. infantum* v oblastech Mediteránu a v Jižní Americe (Pavli and Maltezou, 2010; Schönian *et al.*, 2011).

V posledních letech dochází k šíření leishmaniózy především díky pohybu obyvatelstva (sezónní dělníci, války, hladomory, turistika) a další lidské činnosti (urbanize,

odlesňování oblastí, zemědělství). Počet publikací zabývajících se problematikou leishmaniózy z hlediska importu tohoto onemocnění do neendemických oblastí stále přibývá (Antinori *et al.*, 2012; Pavli and Maltezou, 2010). Jelikož vakcína chránící lidi proti leishmanióze nebyla stále vyvinuta, jako prevence slouží především vyhnutí se poštipání flebotomy – snaha omezit výskyt v přírodě po soumraku, kdy flebotomové začínají být nejvíce aktivní, používat repelenty a vhodný oděv (Pavli and Maltezou, 2010). Pro kontrolu flebotomů v endemických oblastech se používají postřiky k odpuzení či usmrcení přenašeče. Jedná se např. o reziduální postřiky, často aplikované na stěny obydlí, plošné postřiky, insekticidy napuštěné sítě a moskytiéry či aplikace insekticidů do samotných líhnišť flebotomů. Použití poslední zmíněné techniky je však omezeno našimi znalostmi o lokalizaci líhnišť (Claborn, 2010).

2.2 Imunitní odpověď hostitele namířená proti leishmaniím

Protilátková imunitní odpověď

Protilátky proti leishmaniím produkované hostitelem neposkytují ochranu proti leishmanióze, ale jsou spíše ukazatelem rozvoje infekce/akutní fáze onemocnění (Sharma and Singh, 2009).

Na myším modelu byl porovnáván vliv anti-leishmaniových IgG protilátek na rozvoj onemocnění. Miles *et al.* (2005) pro tyto experimenty zvolili J_H Balb/c myši s delecí v genu pro těžký řetězec IgG, což se odrazilo ve ztrátě schopnosti produkovat tyto protilátky. Jako kontrolní skupina jim sloužila Balb/c myš se zachovanou produkcí IgG protilátek. Mutantní myš byla v porovnání s kontrolní myší rezistentní k infekci způsobené *L. major*, což se odrazilo ve vytvoření menší léze obsahující méně leishmanií. Po podání imunního séra obsahující IgG protilátky se průběh infekce u mutantních myší rapidně zhoršil a velikost léze dosahovala rozměru jako u myší kontrolních. Zvětšení léze zároveň korelovalo s přibližně dvojnásobně zvýšenou produkcí IL-10 (Miles *et al.*, 2005). Obdobných výsledků bylo dosaženo také v experimentech s *L. amazonensis* a *L. pifanoi*. Myši s funkčními B lymfocyty, ale postrádající cirkulující protilátky, vyvíjely v porovnání s kontrolní skupinou znatelně menší léze. Podání imunního séra těmito myším způsobilo rozvoj onemocnění, z čehož lze soudit, že přítomnost cirkulujících protilátek souvisí s rozvojem patogeneze způsobené komplexem *L. mexicana* (*L. amazonensis* a *L. pifanoi*) (Kima *et al.*, 2000).

Na modelu lidské viscerální leishmaniózy způsobené *L. chagasi* pozitivně korelovaly vysoké titry IgG protilátek s vrcholem onemocnění a zároveň s negativní DTH odpovědí na

leishmaniový antigen. Úspěšné vyléčení pacienta se odrazilo v poklesu těchto protilátek a v detekci protektivní DTH odpovědi (Miles *et al.*, 2005). Publikací, které se zabývají srovnáním titrů protilátek u pacientů s aktivní viscerální leishmaniózou a u pacientů léčených z tohoto onemocnění, je velké množství. Příkladem může být práce Matta *et al.* (2000), kdy pacienti s americkou viscerální leishmaniózou způsobenou *L. chagasi* vykazovali vysoké titry IgG protilátek, které po залечení rapidně klesaly (da Matta *et al.*, 2000).

Nejvíce publikací, věnujících se anti-leishmaniovým protilátkám, však přináší studium leishmaniózy u psů, kdy korelace mezi klinickými příznaky a séropozitivitou je důležitým ukazatelem vývoje infekce u psů, což má široké využití v diagnostice tohoto onemocnění (Maia *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2008).

Buněčná imunitní odpověď

Obrana proti leishmaniové infekci je zcela závislá na složkách buněčné imunity a jejich vzájemné kooperaci. Klíčovými momenty obranyschopnosti vůči leishmanióze jsou aktivace T lymfocytů a produkce cytokinů, které následně aktivují hlavní obranné buňky - makrofágy (Sharma and Singh, 2009).

Následující kapitoly předložené diplomové práce se budou podrobněji zabývat rozvojem protektivní, tedy buněčné imunity vůči leishmaniím.

2.2.1 Neutrofilý a jejich úloha při leishmanióze

Neutrofilý jsou buňky vrozené imunity a společně s makrofágy patří mezi profesionální fagocyty. Jsou prvními buňkami, které se vyskytují v místě, kam byl parazit inokulován a poskytují tak leishmaniím možnost dočasného úkrytu před imunitní odpovědí hostitele. Role neutrofilů coby buněk, které jsou první v kontaktu s leishmanii - byla popsána jak při aplikaci leishmanií do hostitele pomocí injekce (Beil *et al.*, 1992), tak v případě přirozeném – při inokulaci leishmanií prostřednictvím flebotoma (Peters *et al.*, 2008).

Neutrofilý, které hrají podstatnou roli v prvních fázích infekce se vyznačují krátkou životností. Během 6 až 12 hodin podléhají samovolné apoptóze. U infekce *L. major* bylo popsáno, že živé leishmanie jsou schopné oddálit apoptózu lidských neutrofilů až na 42 hodin. Děje se tak prostřednictvím inhibice aktivity enzymu kaspáza-3, jednoho z klíčových enzymů účastnících se spontánní apoptózy (Aga *et al.*, 2002). U *L. donovani* byl antiapoptotický efekt pozorován nejen po aplikaci živých leishmanií, ale také při stimulaci

supernatantem získaným z makrofágů infikovaných *L. donovani* a také po přidání samotného LPG (Moore and Matlashewski, 1994).

Infikované neutrofily jsou také stimulovány ke zvýšené produkci chemokinu MIP-1 β . Jedná se o známý chemoatraktant, který atrahuje monocyty do místa infekce (van Zandbergen *et al.*, 2004). Apoptotizující neutrofily jsou pak rychle pohlceny makrofágy, čímž se leishmanie dostanou do své cílové hostitelské buňky. Tento způsob nákazy je popisován jako teorie Trojského koně (Laskay *et al.*, 2003). Nákaza zprostředkovaná neutrofily má dvě výhody – nedochází zde k přímému kontaktu leishmanií s receptory makrofágů (nedojde k aktivaci makrofágů) a fagocytóza apoptotických buněk v makrofázích nespouští efektorové mechanismy proti parazitovi (van Zandbergen *et al.*, 2004).

Alternativní cestou vstupu leishmanií do makrofágů je únik leishmanií z apoptózy podléhajících neutrofilů a následné pohlcení makrofágy (Peters *et al.*, 2008). Avšak dodnes stále není jasné, zdali a v jakém případě se uplatňuje mechanismus Trojského koně a kdy naopak leishmanie opouští apoptotizující neutrofily s následným pohlcením makrofágy.

2.2.2 Makrofágy a jejich úloha při leishmanióze

Makrofágy mají stejně jako neutrofily, basofily, eosinofily, dendritické buňky a mastocyty svůj původ v myeloidní linii kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni. Mezistupněm mezi kmenovými buňkami a makrofágy jsou monocyty, které putují z kostní dřene do krevního oběhu. Z krevního oběhu monocyty následně pronikají do tkání, kde doplňují tkáňově specifické makrofágy vyskytující se v kostech (osteoklasty), v centrální nervové soustavě (mikrogliaální buňky), v alveolech, v pojivové tkáni (histiocyty), v zažívacím traktu, v játrech (Kupfferovy buňky), v slezině a peritoneu. Jejich společnou vlastností je schopnost fagocytovat. Fagocytují buňky těla vlastní - například buňky podléhající apoptóze nebo staré erytrocyty (2×10^{11} erytrocytů/den). Neméně důležitá je i jejich schopnost rozpoznat a fagocytovat buňky cizorodé (Klein and Horejsi, 1997; Mosser and Edwards, 2008).

Makrofágy se vyznačují jistou heterogenitou, na kterou jako první poukázal Stein a spol. (1992). Zjistil, že makrofágy stimulované IL-4 vykazují fenotyp odlišný od klasicky aktivovaných makrofágů, jež jsou aktivovány pomocí IFN- γ a TNF- α (Stein *et al.*, 1992). Tento typ makrofágů byl pojmenován jako „alternativní“. Pojem alternativní se však nestal plně uznávaným mezi autory, jelikož naznačuje, že jiná forma kromě klasicky a alternativních makrofágů neexistuje. Ve skutečnosti je popisováno více typů makrofágů s odlišnou

fyziologií. Mosser *et al.* (2008) popisují vedle klasicky aktivovaných makrofágů tzv. makrofágy účastníci se hojení tkání, jež odpovídají výše zmíněným alternativně aktivovaným makrofágům a dále tzv. regulační makrofágy, jež jsou aktivovány pomocí nejrozličnějších stimulů, jako jsou imunokomplexy, prostaglandiny, glukokortikoidy, apoptotizující buňky či IL-10. Takto aktivované regulační makrofágy produkují velké množství IL-10, jež inhibuje zánětlivou imunitní odpověď (Mosser and Edwards, 2008).

V předložené diplomové práci se budu zmiňovat pouze o klasicky a alternativně aktivovaných makrofázích, jelikož právě tyto dva typy jsou nejlépe charakterizované a ukázalo se, že hrají klíčovou roli v leishmanióze.

Makrofágy aktivované klasickou cestou

Pro aktivaci tohoto typu makrofágů je důležitá spolupráce s Th1 lymfocyty. Klíčovou roli v přeměně naivních CD4⁺ lymfocytů v Th1 efektorové lymfocyty mají antigen-prezentující buňky, které na svém povrchu prezentují fragmenty pohlceného parazita. Roli antigen-prezentující buňky často vykonávají samotné makrofágy. Funkcí antigen-prezentujících buněk není pouze prezentace antigenů na svém povrchu, ale zároveň jsou zodpovědné za aktivaci naivních T lymfocytů prostřednictvím produkce cytokinů typu IL-12 a IL-1 (Klein and Horejsi, 1997). Aktivované Th1 lymfocyty pak produkují cytokin IFN- γ , který je hlavním aktivátorem klasicky aktivovaných makrofágů. Takto aktivované makrofágy jsou poté schopné pohlcené leishmanie degradovat (Murray *et al.*, 1983). Th1 buňky však nejsou jediným zdrojem IFN- γ potřebného pro aktivaci makrofágů, důležitými producenty jsou také NK buňky (Scharton and Scott, 1993). Bylo popsáno, že účinnější aktivace makrofágů je dosaženo přidáním bakteriálního LPS, cytokinu TNF- α (Drapier *et al.*, 1988) či amastigotů *L. major* (Green *et al.*, 1990a), které působí synergesticky s IFN- γ .

Po aktivaci makrofágů jsou spuštěny nejrozličnější efektorové mechanismy namířené proti pohlcenému parazitovi. V této obraně se vedle produkce NO a kaskády oxidativního vzplanutí účastní také produkce fagolysosomálních degradačních enzymů jako jsou proteázy, nukleázy, fosfatázy, lipázy a esterázy (Van Assche *et al.*, 2011).

V boji proti leishmaniím se uplatňují především dva mikrobicidní produkty – radikály dusíku (RNI) (Liew *et al.*, 1990) a kyslíkaté radikály (ROI) (Murray, 1982). Oba tyto produkty jsou významné v rané fázi infekce především tím, že regulují rozsah mikrobiální replikace (Van Assche *et al.*, 2011).

Klasicky aktivované makrofágy exprimují enzym iNOS. iNOS je oxidoreduktáza, která je schopná z terminálního N-konce L-argininu za přítomnosti NADPH a O_2 produkovat L-citrulin a NO. Jedná se o dvě po sobě jdoucí reakce, kdy produktem první reakce je N^{ω} -hydroxy-L-arginin. Následující hydrolýza dává vznik L-citrulinu, NO a superoxidu ($O_2^{\cdot-}$), z kterého následně vzniká peroxynitrát ($ONOO^{\cdot-}$). Tyto produkty (NO, O_2 , $ONOO^{\cdot-}$) jsou silně toxické a způsobují destrukci patogenů (Balana-Fouce *et al.*, 2012), což bylo popsáno i v případě *L. major* (Green *et al.*, 1990b). Radikály kyslíku (ROI) a dusíku (RNI) však mohou poškodit i vlastní tkáň, proto je důležité udržovat tyto děje pod silným regulačním tlakem. Nejvýznamnějšími cytokiny, které tlumí zánětlivou aktivitu makrofágů, jsou TGF- β a IL-10 (Mosser, 2003).

Jako důkaz, že NO je kritickým faktorem pro potlačení leishmaniové infekce, byly provedeny experimenty u mutantních myší s porušeným genem pro iNOS. Tyto myši v porovnání s kontrolní skupinou produkovaly po stimulaci IFN- γ a LPS mnohem méně NO, což se odrazilo v neschopnosti infekci *L. major* potlačit. Množství produkovaného NO bylo srovnatelné s produkcí NO u nestimulovaných makrofágů. U kontrolních myší došlo k samovolnému vyléčení léze, kdežto u mutantních jedinců infekce visceralizovala (Wei *et al.*, 1995).

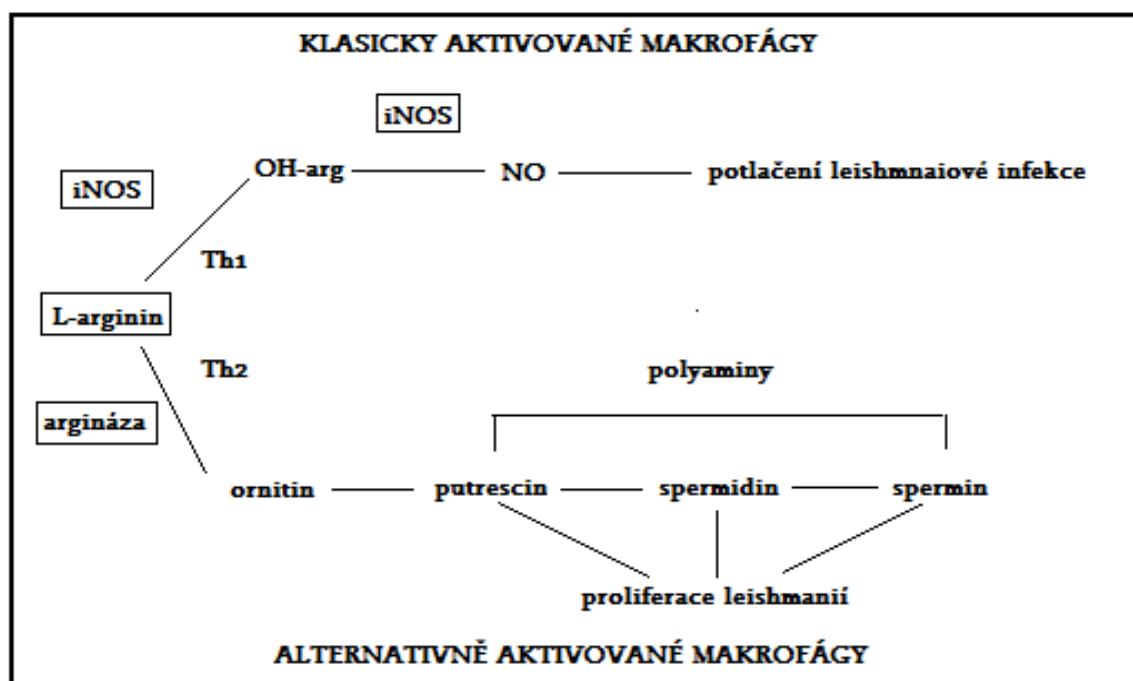
Otázkou je, zdali jsou pro potlačení leishmaniové infekce klíčové oba výše zmíněné mikrobicidní mechanismy. Murray *et al.* (1999) připravili linii myší deficientních v gp91, podjednotce komplexu NADPH oxidázy. Druhou skupinou byly myši stejného kmene, ale s porušeným genem pro iNOS. Na rozdíl od myši deficientní v produkci NO, myš deficientní v produkci ROI dokázala infekci *L. donovani* později potlačit. To naznačuje, že mechanismus produkce ROI může být částečně postradatelný, ale výsledek infekce viscerální leishmaniózy je plně závislý na produkci NO (Murray and Nathan, 1999).

Makrofágy aktivované alternativní cestou

Alternativně aktivované makrofágy se diferencují v prostředí bohatém na protizánětlivé cytokiny jako je IL-4, IL-10 a IL-13, které jsou produkovány nejčastěji basofily či mastocyty (Corraliza *et al.*, 1995; Munder *et al.*, 1998). Od klasicky aktivovaných makrofágů se liší sníženou schopností prezentovat antigen, což má za následek inhibici proliferace T lymfocytů (Schebesch *et al.*, 1997), a zvýšenou expresí enzymu argináza, který jako substrát využívá L-arginin (tedy stejný substrát jako enzym iNOS klasicky aktivovaných makrofágů).

Aminokyselina L-arginin se účastní několika metabolických pochodů uvnitř makrofágů. Paraziti jako leishmanie nebo *Trypanosoma cruzi* jsou díky nedostatku biosyntézy této aminokyseliny plně závislí na svém hostiteli (Balana-Fouce *et al.*, 2012).

L-arginin v reakci katalyzované enzymem argináza dává vzniknout produktům L-ornitinu a močovině. L-ornitin může být transformován pomocí ornitin aminotransferázy na L-prolin, což je výchozí aminokyselina pro syntézu kolagenu (Balana-Fouce *et al.*, 2012). Ornitin je zároveň prekursorem polyaminů, který společně s výše zmíněným kolagenem podporuje intracelulární růst leishmanií (Inieta *et al.*, 2001).



Obrázek 1: Schéma klasické a alternativní aktivace makrofágů

2.2.3 Cytokinové prostředí a jeho úloha při leishmanióze

Existence dvou subpopulací CD4⁺ lymfocytů, zvaných Th1 a Th2, byla popsána Mosmannem *et al.* roku 1986. Tyto dvě subpopulace se liší v typu produkovaných cytokinů. Pro Th1 lymfocyty je typická produkce cytokinů IFN- γ , IL-2 a TNF- α , pro Th2 lymfocyty IL-4, IL-13 a IL-5 (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann and Sad, 1996).

Z testů s *L. major* vyšlo najevo, že o přiřazení myšního kmene k druhu rezistentnímu či vnímavému k leishmanióze rozhoduje aktivace Th1 nebo Th2 subpopulace lymfocytů. Th1 lymfocyty produkující IFN- γ a IL-2 jsou efektivní v potlačení leishmaniové infekce a vedou

k uzdravení myšního hostitele. Naproti tomu, rozvoj leishmaniózy je spojován s Th2 lymfocyty, produkujícími IL-4 a IL-5 (Scott *et al.*, 1988).

Tvrzení, že IFN- γ je kritickým cytokinem v aktivaci makrofágů a následném spuštění Th1 imunitní odpovědi vedoucí k usmrcení parazita podpořil Belosevic *et al.* (1989), pokusem s podáním protilátky proti IFN- γ rezistentnímu kmenu myši C3H/HeN. Imunitní systém těchto myši nebyl schopen udržet infekci pod kontrolou, došlo k polarizaci Th1 imunitní odpovědi směrem k Th2, což se odrazilo na zhoršeném průběhu infekce. U těchto myši došlo k mnohonásobnému zvětšení léze, vzrůstu počtu amastigotů v tkáni a nakonec i k metastázi do vnitřních orgánů (Belosevic *et al.*, 1989). Podobného výsledku bylo dosaženo i u dalšího geneticky rezistentního kmene myši C57BL/6. Experiment byl proveden s heterozygotními knock out myšmi s deletovaným genem pro IFN- γ . Tyto myši se fenotypově projeví jako kmen citlivý k *L. major* s CD4⁺ lymfocyty produkující cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13, tedy cytokiny typické pro Th2 imunitní odpověď (Wang *et al.*, 1994).

Podobným způsobem byla potvrzena úloha IL-4 v polarizaci imunitní odpovědi směrem k Th2. Balb/c myším, citlivým k leishmanióze, byla podána monoklonální protilátka proti IL-4. Tyto myši se staly rezistentní k jinak fatální infekci způsobené *L. major* (Sadick *et al.*, 1990). Ke stejnému výsledku vedla i delece genu pro IL-4 (Kopf *et al.*, 1996).

Neméně důležitý vliv na průběh onemocnění mají cytokiny produkované buňkami prezentující antigen. Myši kmen geneticky rezistentní k infekci způsobené *L. major* se v případě absence produkce IL-12 stává kmenem citlivým. Naproti tomu u citlivého kmene Balb/c se po aplikaci IL-12 rozvíjí protektivní imunita proti tomuto onemocnění (Heinzel *et al.*, 1993; Sypek *et al.*, 1993). Obdobný trend byl sledován v případě TNF- α , kdy výsledek infekce *L. major* byl u myši s deletovaným genem pro TNF- α fatální (Wilhelm *et al.*, 2001). U typicky protizánětlivého cytokinu TGF- β , který inhibuje produkci IFN- γ a tím nepřímo blokuje klasickou cestu aktivace makrofágů, dochází k zvýšení citlivosti myši vůči *L. major* (Barralnetto *et al.*, 1992).

V pozdějších studiích se ukázalo, že polarizace Th lymfocytů k Th1 či Th2 subpopulacím nemusí být indikátorem citlivosti či resistance myši k leishmanióze u všech kombinací parazit/hostitel. Příkladem může být vznik chronické kožní leishmaniózy u myši C3HeB/FeJ infikovaných *L. amazonensis*. Přestože u těchto myši byla zaznamenána Th1 imunitní odpověď vůči leishmaniím, nevedlo to k vyléčení ani zlepšení onemocnění (Vanloubbeeck *et al.*, 2004).

2.3 Povrchové molekuly leishmanií a jejich vliv na rozvoj infekce

Povrchové glykokonjugáty leishmanií hrají významnou roli v jednotlivých fázích životního cyklu, kdy zprostředkovávají interakci mezi parazitem, vektorem a hostitelem. Jednotlivá vývojová stádía se od sebe liší z hlediska výskytu povrchových struktur, které mohou mít vliv na rozvoj leishmaniózy. Glykokalyx, povrchový plášť leishmanií, je silně vyvinut u promastigotů, nikoli však u amastigotů. U jednotlivých promastigotních stádií se liší tloušťkou - u procyklických promastigotů *L. major* dosahuje kolem 7 nm, u metacyklických promastigotů minimálně 17 nm (Pimenta et al., 1991).

Lipofosfoglykan (LPG) je hlavní povrchovou molekulou promastigotů. Jedná se o opakující se jednotku fosforylovaného oligosacharidu, jež je připojena k membráně GPI kotvou. Struktura LPG se liší mezi stádii procyklických a metacyklických promastigotů. U metacyklických promastigotů je vrstva výrazně silnější (tvoří ji průměrně 30 jednotek) než u procyklických promastigotů (průměrně 14 jednotek). U amastigotů LPG není přítomen vůbec (McConville et al., 1992).

LPG pomáhá leishmaniím nejrůznějším způsobem odolat nepřátelskému prostředí, a to jak uvnitř zažívacího traktu flebotoma, tak i v prostředí savčího hostitele. Příkladem může být schopnost resistance metacyklických promastigotů vůči komplementu. Procyklickí promastigoti *L. major* jsou v porovnání s metacykly citliví k lyzi zprostředkované komplementem. Citlivost či rezistence je v tomto případě dána délkou povrchového LPG. Delší LPG metacyklů tvoří bariéru, která zabrání navázání C5b - C9 podjednotek komplementu na membránu parazita. Lytický pór se tak sice utvoří, avšak nedosáhne k membráně parazita a poté je z povrchu leishmanie spontánně odvržen (Puentes et al., 1990). Jinak je tomu u *L. donovani*, která zamezí formování lytického póru alternativním způsobem. Na LPG *L. donovani* se váže především inaktivní forma C3b (iC3b), která není schopna na sebe navázat C5 konvertázu (Puentes et al., 1989).

LPG se dále společně s IFN- γ účastní regulace exprese iNOS, čímž opět ovlivňuje přežívání parazita. Makrofágy preinkubované s LPG inhibovaly po přidání IFN- γ produkci NO. Za tuto inhibici byla zodpovědná aktivní složka LPG – tzv. fosfoglykan. Inhibice byla závislá na množství podaného fosfoglykanu (Proudfoot et al., 1996).

Podobně jako LPG se u promastigotů vyskytuje metaloproteáza gp63, jejíž výskyt je u amastigotů silně redukován – z 3×10^5 molekul/promastigota na 10^3 molekul/amastigota (Schneider et al., 1992). S expresí gp63 koreluje rezistence k lyzi způsobené komplementem. Promastigoti, kteří měli na svém povrchu proteolyticky aktivní gp63, byli mnohem víc

rezistentní k lyzi než paraziti deficientní v expresi gp63. Dělo se tak prostřednictvím konverze C3b podjednotky na inaktivní formu iC3b (Brittingham *et al.*, 1995).

Výše popsaná opsonizace metacyklů pomocí C3b a iC3b podjednotky je významná při vstupu leishmanií do své cílové buňky – makrofága. C3b a iC3b podjednotky slouží jako ligandy pro komplementové receptory CR1 a CR3 vyskytujících se na povrchu makrofágů a spouštějící jejich fagocytární aktivitu (da Silva *et al.*, 1988; Da Silva *et al.*, 1989).

Třetí významnou molekulou leishmanií je glykoinositol fosfolipid (GIPL), který se vyskytuje na povrchu promastigotů i amastigotů. Tyto glykolipidy pokrývají značnou část buněčného povrchu leishmanií – udává se 10^7 molekul/buňku. Jelikož je u amastigotů LPG a gp63 silně redukován, GIPL zůstává nejvíce exprimovaným povrchovým glykolipidem amastigotních stádií (McConville and Blackwell, 1991). Proudfoot *et al.* (1995) popsali, že GIPL na povrchu amastigotů způsobuje snížení produkce NO v makrofázích a s tím spojenou mikrobicidní aktivitu těchto buněk namířenou proti leishmanii. Stupeň inhibice v produkci NO byl zároveň závislý na množství podaného GIPL (Proudfoot *et al.*, 1995).

Po fagocytóze leishmanie makrofágem dochází k diferenciaci promastigota v amastigota. Promastigoti jsou citliví na působení kyselého a hydrolytického prostředí fagolysosomu, proto musí pozdržet fúzi fagosomu s lysosomem. Tento proces, závislý na povrchových molekulách LPG, dá prostor přeměně citlivého promastigota v odolného amastigota (Desjardins and Descoteaux, 1997).

2.4 Další molekuly leishmanií ovlivňující vývoj infekce

Povrchové molekuly leishmanií nejsou jediným faktorem, který může ovlivnit imunitu hostitele a z toho vyplývající výsledek infekce. Při sání infikovaného flebotoma na hostiteli je kromě leishmanií do rány inokulován promastigoty produkován sekret (PSG). Tato hmota obaluje a hromadí ve flebotomovi infekční metacyklická stadia leishmanií, čímž vytváří zátku v přední části střeva flebotoma, která blokuje lumen jeho zažívacího traktu (Rogers *et al.*, 2002; Stierhof *et al.*, 1999). Na dvou různých kombinacích parazit-vektor bylo stanoveno, že hlavní složkou PSG je filamentózní proteofosfoglykan promastigotů (fPPG) sekretovaný samotnými leishmaniemi (Stierhof *et al.*, 1999).

Přímá asociace mezi metacyklogenezí (vznikem infekčních metacyklů) a sekrecí fPPG byla sledována u metacyklických stádií *L. mexicana* a *L. infantum* ve vektorovi *Lu. longipalpis*. Vývoj leishmanií v infekční stadia byl rychlejší u druhu *L. mexicana*, kdy přítomnost fPPG byla potvrzena již druhý den. V případě *L. infantum* byla sekrece fPPG detekována čtvrtý den (Rogers and Bates, 2007).

Schopnost leishmanií porušovat výstelku stomodeální valvy (Schlein *et al.*, 1992; Volf *et al.*, 2004) společně s blokováním střeva prostřednictvím sekrece fPPG (Stierhof *et al.*, 1999) způsobuje ve flebotomovi narušení funkce sání. Infikovaní flebotomové se nedokáží plně nasát, sají proto déle a často na více místech či více hostitelích, čímž je zvýšena úspěšnost přenosu leishmanií. Flebotomové infikovaní *L. mexicana* sáli na myši 2,4 krát delší dobu a flebotomové infikovaní *L. infantum* 1,3 krát delší dobu než k nim náležící neinfikované kontroly. U obou druhů leishmanií byla zároveň prokázána pozitivní korelace mezi délkou sání na hostiteli a počtem infekčních stádií ve flebotomovi. (Rogers and Bates, 2007). Déle sály i samice *Lu. longipalpis* přenášející dermatotropní kmen *L. infantum* (CUK3) v porovnání se samicemi nakaženými, ale nepřenášející leishmanie do hostitele (1,5 krát). Doba sání těchto samic byla zároveň 1,8 krát delší v porovnání s neinfikovanými kontrolami. Podobně tomu bylo i u samic *P. perniciosus* přenášejících dermatotropní kmen *L. infantum* (CUK3) i viscerotropní kmen *L. infantum* (IMT373) – infikované samice sály 1,5 a 1,2 krát déle v porovnání s neinfikovanými kontrolami (Maia *et al.*, 2011). Při samotném sání dochází k zpětnému toku krve do hostitele, a tím k regurgitaci leishmanií (Rogers, 2012; Rogers and Bates, 2007).

Kromě zvýšené pravděpodobnosti přenosu leishmanií do těla hostitele se prokázala role PSG jako virulenčního faktoru při přenosu *L. mexicana*, což se odrazilo ve zhoršení infekce kožní leishmaniózy a to jak u myši citlivých (Balb/c), tak rezistentních (CBA/Ca) k tomuto onemocnění (Rogers *et al.*, 2004). Otázka mechanismu, kterým PSG zhoršuje průběh infekce způsobený *L. mexicana* byla zodpovězena roku 2009. Bylo popsáno, že PSG podporuje alternativní cestu aktivace makrofágů prostřednictvím zvýšené exprese enzymu arginázy a její aktivity, čímž inhibuje tvorbu mikrobicidního NO (prostřednictvím vyčerpání společného substrátu L-argininu) (Rogers *et al.*, 2009).

Jelikož je při sání infikované samice flebotoma do těla hostitele vpraven kromě PSG také obsah slinných žláz, Rogers *et al.* (2009) se dále pokusili stanovit vliv kombinace obou složek na průběh onemocnění. Ukázalo se, že tyto dvě složky mají vůči sobě antagonistický účinek, což může být způsobeno rozdílným působením na imunitu hostitele, o jehož podstatě se stále spekuluje (Rogers *et al.*, 2004). Synergický účinek dvou výše zmíněných faktorů se naopak prokázal v atrakci makrofágů a neutrofilů do místa inokulace (Rogers *et al.*, 2009). Vliv samotných slinných žláz flebotomů na vývoj leishmaniové infekce pak podrobněji popisuje následující kapitola.

2.5 Molekuly slinných žláz flebotomů a jejich vliv na rozvoj infekce

Flebotomové nejsou pasivními v procesu inokulace leishmanií do těla hostitele. Již před 25 lety Ribeiro *et al.* dokázali (1987), že společně s leishmaniemi jsou do hostitele inokulovány také složky slinných žláz flebotomů, které mají výrazný vliv na následný vývoj infekce (Ribeiro, 1987).

U infekce *L. major* bylo popsáno, že velikost leishmaniových lézí byla výrazně větší, pokud byly do myši vpraveny společně s leishmaniemi zhomogenizované slinné žlázy *Lutzomyia longipalpis*. Vzniklá kožní léze dosahovala u této skupiny 5 – 10 krát větších rozměrů v porovnání se skupinou kontrolní, která byla infikovaná pouze samotnými leishmaniemi. Mnohonásobně vyšší byl i počet leishmanií (Titus and Ribeiro, 1988). Tento fenomén je dnes známý jako tzv. „enhancing efekt“ slinných žláz flebotomů. Bylo popsáno, že přítomnost tohoto efektu a jeho uplatnění může být ovlivněno druhem leishmanie. Zatímco u druhu *L. major* se „enhancing efekt“ slinných žláz *Lu. longipalpis* uplatňuje již při infekční dávce 10 leishmanií (Titus and Ribeiro, 1988), při infekci druhem *L. braziliensis* byl enhancing efekt patrný až při infekční dávce 10^4 leishmanií (Lima and Titus, 1996).

Ze slinných žláz *Lu. longipalpis* byl později vyzolován peptid, který usnadňuje sání samice, zamezuje vzniku otoku a svědění. Tento peptid je dnes známý jako vasodilatátor maxadilan, který se nachází v koncentraci zhruba 10 ng/pár slinných žláz (Lerner *et al.*, 1991). V pozdějších experimentech se ukázalo, že vhodně zvolené množství maxadilanu propaguje vývoj leishmaniózy stejnou měrou jako tomu odpovídající ekvivalent kompletní slinné žlázy *Lu. longipalpis* (Morris *et al.*, 2001; Rohousova and Volf, 2006).

Brodie *et al.* (2007) posuzovali účinek maxadilanu na funkci makrofágů. Zjistilo se, že ovlivňuje produkci cytokinů, a to směrem k Th2 imunitní odpovědi. Makrofágy produkovaly zvýšené množství protizánětlivých cytokinů IL-10, IL-6, TGF- β a naproti tomu produkovaly méně TNF- α a IL-12p70, což se odrazilo v inhibici produkce NO a v mnohonásobném namnožení leishmanií v makrofázích (Brodie *et al.*, 2007).

U starosvětského druhu *P. papatasi* byl také pozorován enhancing efekt slinných žláz u naivních myší infikovaných *L. major* (Theodos *et al.*, 1991). Waitumbi *et al.* (1998) popsali malou molekulu rozpustnou v etanolu a rezistentní varu, která by mohla mít obdobný účinek jako maxadilan ve slinách *Lu. longipalpis*. Definovali, že tato molekula je inhibitorem protein fosfatázy 1 a protein fosfatázy 2A v myších makrofázích (Waitumbi and Warburg, 1998). Výše zmíněné protein fosfatázy jsou důležitým pojítkem v signalizační dráze pro syntézu NO (Dong *et al.*, 1995). Tento inhibitor proto způsobuje sníženou expresi genu pro iNOS a

následnou inhibici produkce NO v aktivovaných makrofázích. Přidání jedné slinné žlázy *P. papatasi* k makrofágům způsobilo 50% redukci exprese iNOS mRNA (Waitumbi and Warburg, 1998). O rok později Ribeiro *et al.* (1999) charakterizovali tento inhibitor protein fosfatázy 1 a 2A jako molekuly 5'-AMP a adenosin (Ribeiro *et al.*, 1999). Bylo popsáno, že právě adenosin je zodpovědný za výše popsanou inhibici v expresi genu pro iNOS. Pomocí RT-PCR bylo stanoveno, že 1 μ M adenosin nebo slinné žlázy *P. papatasi* obsahující odpovídající množství adenosinu redukuje z 30-40 % exprese tohoto genu (Katz *et al.*, 2000).

Enhancing efekt slinných žláz flebotomů byl dále potvrzen v těchto kombinacích flebotomus - leishmanie: *Lu. longipalpis* – *L. braziliensis* (Samuelson *et al.*, 1991), *Lu. longipalpis* – *L. amazonensis* (Theodos *et al.*, 1991), *Lu. longipalpis* – *L. chagasi* (Warburg *et al.*, 1994) a *P. duboscqi* – *L. major* (Rohoušová *et al.*, 2011).

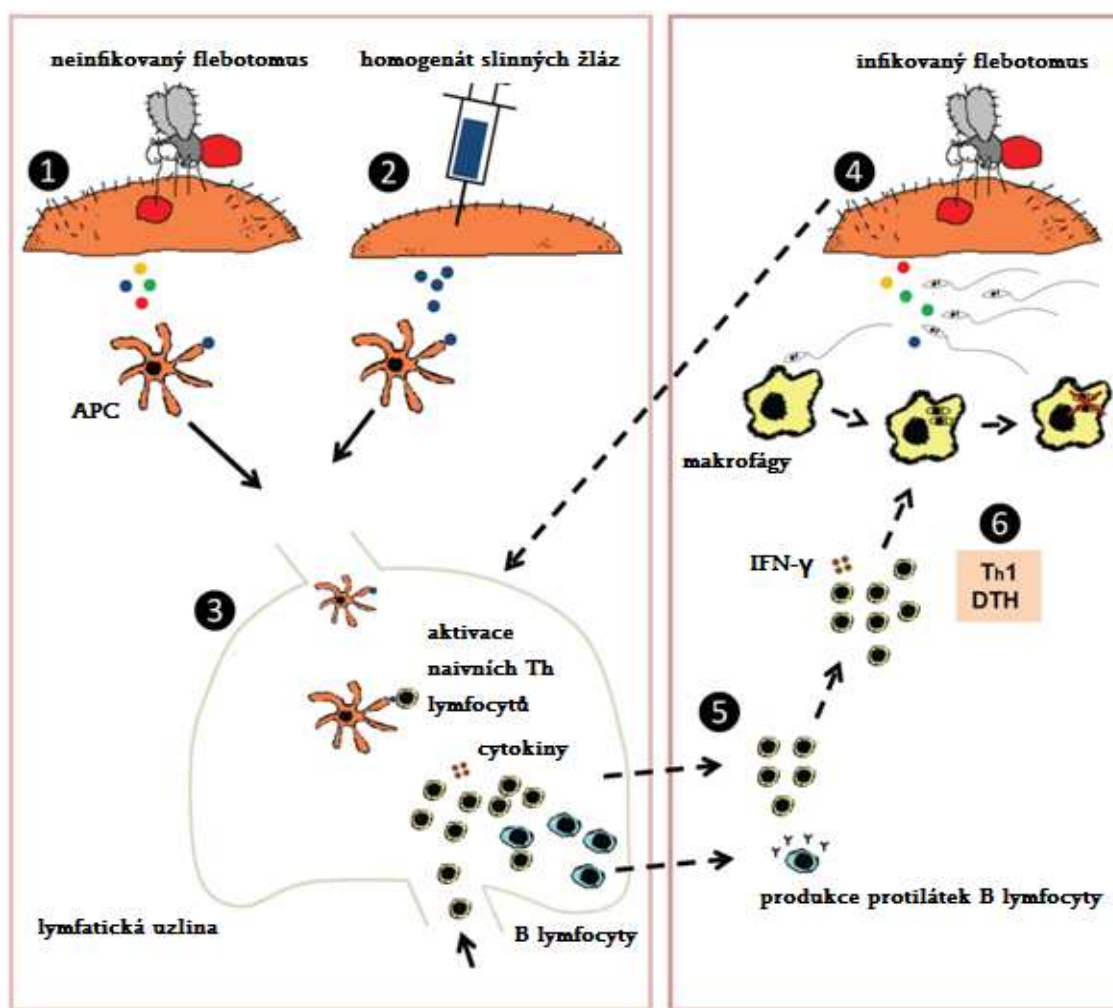
Na základě hypotézy, že vývoj leishmaniózy může být závislý na předchozím kontaktu se slinami vektora, Belkaid *et al.* (1998) provedli experimenty, kde sledovali průběh infekce u myší imunizovaných homogenátem slinných žláz *P. papatasi* a poté infikovaných *L. major* v kombinaci se slinnými žlázami. Tato skupina byla porovnávána se skupinou kontrolní, která zůstala bez imunizace. Množství leishmanií bylo 8. týden od infekce u imunizované skupiny stonásobně nižší než u skupiny kontrolní (Belkaid *et al.*, 1998). Výsledky ukázaly, že imunizace myší slinami vektora a s tím související nárůst protilátek proti složkám žláz kompletně neutralizuje enhancing efekt slin vektora a to jak u kmene myší citlivých (Balb/c), tak rezistentních (C57BL/6) k leishmanióze. Oba imunizované kmeny myší se chovaly z hlediska velikosti léze obdobně jako skupiny naivních myší, které byly infikovány samotnými leishmaniemi (Belkaid *et al.*, 1998). Stejného výsledku bylo dosaženo, vystavením myší sání samic *P. papatasi* před infekcí *L. major*. Ochrana proti leishmaniím korelovala se vznikem silné DTH reakce na sliny flebotomů a zároveň imunizované myši produkovaly v místě sání více IFN- γ a IL-12 v porovnání s kontrolní skupinou (Kamhawi *et al.*, 2000).

Úloha maxadilanu a zároveň jeho uplatnění v ochraně proti *L. major* u imunizovaných myších byla potvrzena Morrisem *et al.* (2001). Aplikace tohoto vasodilatátoru vyvolala v myších částečnou resistenci vůči následné infekci *L. major*. Kožní léze byla u vakcinovaných myší 3-5 krát menší v porovnání s neimunizovanou skupinou a zároveň tyto myši dokázaly dříve vyhojit vzniklou lézi (Morris *et al.*, 2001)

Také uplatnění protektivního efektu závisí na kombinaci parazit – vektor. U myší Balb/c imunizovaných homogenátem slinných žláz těchto flebotomů se sice specifická

imunita proti slinným složkám vyvinula, ale nebyla schopná myši chránit před infekcí *L. braziliensis* v kombinaci s výše zmíněným homogenátem slin (de Moura *et al.*, 2007).

Protektivního efektu u imunizovaných myši (expozicí flebotomům nebo aplikací homogenátu slinných žláz) bylo dosaženo také v následujících kombinacích flebotomus - leishmanie: *P. papatasi* – *L. major* (Belkaid *et al.*, 1998; Kamhawi *et al.*, 2000), *P. duboscqi* – *L. major* (Rohoušová *et al.*, 2011), *Lu. longipalpis* – *L. major* (Xu *et al.*, 2011) a *Lu. longipalpis* – *L. amazonensis* (Thiakaki *et al.*, 2005).



Obrázek 2: Navození protekce proti leishmaniím imunizací hostitele

(1), (2) Imunizace hostitele sáním flebotoma nebo aplikací homogenátu slinných žláz, (3) prezentace slinných antigenů T lymfocytům a jejich následná aktivace (4) sání infikovaného flebotoma (5) migrace paměťových Th1 buněk z lymfatické uzliny do místa sání a produkce IFN-γ (6) klasická aktivace makrofágů prostřednictvím produkovaného IFN-γ a následné usmrcení leishmanií; (převzato z Gomes *et al.* 2012, upraveno)

Ze slin *P. papatasi* byl vyizolován imunogenní protein SP15, který byl použit pro zkonstruování DNA vakcíny. Tato vakcína byla experimentálně prověřena na geneticky rezistentním kmenu myši C57BL/6. Myši imunizované SP15 plasmidem a následně infikované *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz byly chráněny před onemocněním (Valenzuela *et al.*, 2001). Poznatek, že stejně imunizované a infikované B-/- myši (bez schopnosti produkovat protilátky) jsou také chráněny proti infekci *L. major*, vede k domněnce, že buněčná imunitní odpověď proti antigenům slin flebotoma je klíčová v protekci proti leishmanióze – a nikoliv tvorba protilátek (Valenzuela *et al.*, 2001).

Samotný vznik DTH odpovědi proti slinám *P. papatasi* však nemusí vždy korelovat s protekcí proti *L. major*. Oliveira *et al.* (2008) izolovali ze slinných žláz protein SP44, který v myších vyvolával DTH odpověď. Myši imunizované tímto proteinem však nevykazovaly protekci proti leishmanióze, ale naopak došlo k zhoršení infekce. Jak se později ukázalo, protekce u myši imunizovaných SP15 proteinem a zhoršení infekce při imunizaci proteinem SP44 korelovala s Th1 a Th2 imunitní odpovědí. Th1 protektivní odpověď u SP15 imunizovaných myši byla spojena se zvýšenou produkcí IFN- γ a IL-12 a naproti tomu se sníženou produkcí IL-4, cytokinu typického pro Th2 imunitní odpověď. Myši imunizované proteinem SP44 naopak vykazovaly 4 krát nižší produkci IFN- γ a 3 krát vyšší produkci IL-4 v porovnání se skupinou imunizovanou SP15 proteinem (Oliveira *et al.*, 2008).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1 Flebotomové

3.1.1 Chov flebotomů

Flebotomové jsou chováni v prostorech se striktně udržovanou teplotou a vlhkostí vzduchu (25-26 °C, 60 - 70% vlhkost) (Volf and Volfova, 2011). Dospělí jedinci jsou vypouštěni do nylonových sítí, které jsou přivázané na kovové konstrukce tvaru krychle (40×40×40 cm). Celá konstrukce se sítí je umístěna v igelitovém pytli, který pomáhá udržet konstantní vlhkost, jejímž zdrojem je vlhčená vata umístěná s plastovým táckem na síti. Samci i samice flebotomů mají k dispozici jako zdroj potravy vatu s 60% cukerným roztokem.

Samice většiny druhů flebotomů jsou gonotrofní, což znamená, že jim musí být poskytnuta krev, jež obsahuje esenciální složky nezbytné pro vývoj vajec. V naší laboratoři poskytujeme samicím flebotomů jako zdroj krve většinou myši uspané anestezií nebo králíky.

Nasáté samice většiny druhů flebotomů se třídí do menších sítí (kovová konstrukce 20×20×20 cm) opatřených opět vlhčenou vatou a cukrem. Zhruba po pěti dnech (opět záleží na druhu flebotoma) jsou přemístěny do sádrou vylitých a destilovanou vodou navlhčených plastových kelímků, kam v rozmezí 2 – 5 dnů kladou vejce. Kelímky jsou po celou dobu vývoje larev umístěny v dózách, které jsou vysypané vlhčeným pískem, jež pomáhá udržovat přiměřenou vlhkost. Celé dózy jsou pak umístěny v 25 – 26 °C.

Z vajec se zhruba po týdně líhnou larvičky prvního instaru (L1), které jsou krmeny jemnou potravou procházející přes vrstvu monofylu. Potrava určená pro larvy flebotomů je složena z mletého králíčího trusu a pelet v poměru 1:1. Tato směs fermentuje po dobu 3-4 týdnů v boxech z plexiskla, kde se udržuje 100% vlhkost a teplota zde dosahuje 25 °C. Po uplynulé době je směs vysušena a nejemno namleta. Jednotlivá vývojová stádia jsou krmena 3krát týdně.

Larvám L2, L3 a L4 se podává hrubší krmná směs, která již nepřechází přes monofyl (larvy jsou schopné pozřít i větší kusy potravy). L4 přestanou přibližně po týdně přijímat potravu a postupně se dostávají do stádia kukly - těmito stádiím již potravu nepodáváme.

Při normálním průběhu vývoje se během 8-10 dnů od zakuklení objevují první dospělci, kteří jsou 3 krát týdně vypouštěni do velké sítě (Volf and Volfova, 2011).

V následující tabulce (tabulka č. 1) jsou uvedeny druhy flebotomů použité v pokusech provedených v rámci diplomové práce.

Tabulka č. 1: druhy flebotomů použitých v diplomové práci

Druh	Původ	Zkratka
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Turecko, 2005	Pap
<i>Phlebotomus duboscqi</i>	Mali, 2008	Dub
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Brazílie, 1991	LuLo
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	Španělsko, 1994	Per
<i>Phlebotomus orientalis</i>	Etiopie, 2010	Ori
<i>Phlebotomus tobbi</i>	Turecko, 2008	Tob

Roztoky: Anestezie – 2% xylazin (Rometar; Spofa), 10% ketamin (Narketan; Vétoquinol), sterilní fyziologický roztok (150 mM NaCl), intraperitoneální dávkování, dle váhy – 150 mg/kg xylazinu a 15 mg/kg ketaminu.

3.1.2 Pitva slinných žláz

Pro naše pokusy bylo potřeba slinných žláz, které byly získávány ze samic flebotomů starých minimálně 3 dny. Tato doba byla stanovena na základě publikace Volf *et al.* 2000, kdy u flebotomů chovaných v 25 – 26 °C dochází k tvorbě kompletního proteinového profilu nejdříve 3. den po vylíhnutí (Volf *et al.*, 2000).

Po znehybnění samic na ledu byla samice uchopena tenkou pinzetou (Sigma-Aldrich, kat. č. T4287-1EA) za křídla a byly jí odstraněny nožičky. Rychlou manipulací byla položena na okraj kapky roztoku Tris-NaCl a pomocí pinzety a zahnutého entomologického špendlíku byla plynule oddělena hlava od hrudi. Při zdárném oddělení hlavy zůstaly žlázy viset za hlavou a bylo možné žlázy podebrat mírně zahnutým entomologickým špendlíkem, separovat od hlavy a přenést do mikrozkuřavky s roztokem Tris-NaCl (počet slinných žláz ku množství μl Tris-NaCl = 1:1). Žlázy byly uchovávány v -20 °C.

V případě potřeby byly žlázy před použitím homogenizovány či sterilizovány filtrací. Homogenizace se dosáhlo opakovaným zmrazením v tekutém dusíku (minimálně 3krát). K filtraci bylo zapotřebí speciálního filtru (Millipore, 0,22 μm , kat. č. UFC30GV0S). Žlázy předředěné v RPMI 1640 do celkového objemu 480 μl byly sterilně přeneseny na filtr a stočeny na stolní centrifuze (Eppendorf MiniSpin, 5 min, 10 300 otáček). Teprve po zfiltrování byly sterilně doředěny na požadovanou koncentraci.

Roztoky: Tris-NaCl = 20mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7,8

3.2 Leishmanie

3.2.1 Vymražení leishmanií a přeočkování

Pro účely této diplomové práce byly prováděny experimenty s druhem *Leishmania major* (kmen MHOM/IL/67/LRC-L137 Jericho II - LV 561) a *L. infantum* (kmen ITOB/TR/2005/CUK3, izolát z *Phlebotomus tobbi*). Leishmanie uložené v kryobance jsou uchovávány ve speciálních mrazuvzdorných mikrozkušavkách naplněných médiem obsahujícím 5 – 10 % kryoprotektivní látku dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich). Po vymražení jsou leishmanie přeočkovány do kultivačních zkumavek s čerstvým médiem a další pasážování je prováděno v intervalu 5 - 7 dnů dle rychlosti množení leishmanií. Leishmanie jsou uchovány v termostatu s 23 °C. V uvedených experimentech byla nejvýše použitou pasáží pasáž číslo 5.

3.2.2 Promývání a počítání leishmanií

Před použitím leishmanií k pokusům bylo nutné leishmanie promýt fyziologickým roztokem a odstranit tak médium, ve kterém byly kultivovány.

Médium s leishmaniami jsme přendali do 15-ti ml zkumavky a stočili na automatické centrifuze JOUAN (rotor S40, 4000 rpm, 8 minut, 23 °C). Poté bylo médium slito do infekčního odpadu, sediment resuspendován ve fyziologickém roztoku do maximálního objemu a opět stočen. Tento postup byl opakován minimálně dvakrát. Po posledním promytí byl sediment resuspendován v 5 ml fyziologického roztoku. Deset µl roztoku jsme smíchali s 990 µl ředícího roztoku obsahující 1% formaldehyd, který leishmanie usmrtil.

Leishmanie počítáme v Bürkerově komůrce pod mikroskopem.

Roztoky:

Ředící roztok – 0,85% NaCl, 1% formaldehyd

Médium pro *L. major* (LV 561) – 10% fetální kravské sérum (Gibco, kat. č. F9665), RPMI 1640 s Hepes (Sigma, kat. č. R5886), 1% amikin (Bristol-Myers Squibb, kat. č. 1038585A2), 1% BME vitamíny (Sigma, kat. č. B6891), 0,5% sterilní moč

Médium pro *L. infantum* (CUK 3) – médium M199 (Sigma), 20% fetální kravské sérum (Gibco, kat. č. F9665), 1% BME vitamíny (Sigma, kat. č. B6891), 0,8% amikin (Bristol-Myers Squibb, kat. č. 1038585A2), 2% sterilní moč

3.3 Pokusy na myším modelu

Pro pokus bylo použito celkem 28 samic inbredního kmene Balb/c (Anlab). Myši dorazily na katedru parazitologie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve stáří 7 týdnů. Byly ponechány minimálně týden v klidu z důvodu aklimatizace na místní podmínky. Všechny manipulace byly prováděny na katedře parazitologie PřF UK pod dozorem osoby vlastníci Certifikát pro práci se zvířaty dle §17 zákona č. 246/1992 sb. (Dr. Kolářová, č.: CZU 934/05).

Před vlastním pokusem byla myším odebrána krev z ocasní arterie do heparinizované kapiláry, která byla následně centrifugována (6000 otáček, 5 minut, centrifuga MPW 310, rotor CM 304). Získané preimunní sérum bylo uloženo v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Myši byly zároveň označeny kyselinou pikrovou.

3.3.1 Imunizace

Myši byly rozdělené do dvou skupin. Jedna skupina myší byla imunizována sáním *P. papatasi* (skupina P), druhá skupina byla kontrolní (skupina K), ponechána až do usmrcení bez expozice sání flebotomů.

Skupina imunizovaných myší byla vystavena sání *P. papatasi*. Sání proběhlo celkem dvakrát v týdenním intervalu. Anestezíí uspané myši byly individuálně umístěny do malých sítí s 35 samicemi *P. papatasi*. Expozice probíhala ve tmě minimálně 1 hodinu. Při jedné expozici se na jedné myši průměrně nasálo $29 \pm 3,8$ (průměr \pm SD) flebotomů. Minimálně 3 dny od poslední imunizace byla myším opět odebrána krev z ocasu do heparinizované kapiláry a takto získané sérum bylo uskladněno v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Experiment byl opakován 3× s celkovým počtem 14 myší ve skupině (K a P).

3.3.2 Infekce

Infekce myší byla prováděna intradermálně do pravého ucha oběma skupinám myší týden po poslední imunizaci. V této fázi experimentu byla každá skupina myší rozdělena na dvě podskupiny. Jedna podskupina byla infikována leishmaniami v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. papatasi* (skupina Pap), druhá podskupina v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* (skupina Dub). Infekční dávka vztažená na 1 myš byla 10^4 promastigotů *L. major* (kmen LV 561) doplněných o homogenát ekvivalentu $\frac{1}{2}$ slinné žlázy *P. papatasi* nebo *P. duboscqi*. Infekční dávka byla aplikovaná v objemu 5 μl .

Celkem jsme tedy měli 4 skupiny myší: 1) kontrolní skupinu infikovanou se slinami *P. papatasi* (K-Pap), 2) kontrolní skupinu infikovanou se slinami *P. duboscqi* (K-Dub), 3) imunizovanou skupinu infikovanou se slinami *P. papatasi* (P-Pap), 4) imunizovanou skupinu infikovanou se slinami *P. duboscqi* (P-Dub)

V týdenních intervalech byly myším měřeny velikosti lézí (2 na sebe kolmé rozměry pomocí digitálního posuvného měřítka) po dobu 9 týdnů. Pro vyhodnocení vývoje leishmaniové léze byly použity hodnoty přepočtené dle vzorce pro obsah plochy elipsy ($S = a \times b \times \pi$).

3.3.3 Usmrcení myší a shromáždění vzorků

Devátý týden po poslední imunizaci došlo k usmrcení myší. Myši byly uspané 200 μ l anestezie. Odběr krve byl uskutečněn z prostřižené podpažní tepny a následovalo usmrcení myši stržením vazy. Dále byly odebrány obě uši, jejich spádové lymfatické uzliny, slezina a játra. Uši a uzliny byly umístěny do mikrozkušavek a uchovány nasucho v -70 °C. Játra byla dána do mikrozkušavek s médiem RPMI 1640 a zamražena. Slezina byla mechanicky zhomogenizována, naředěna v RPMI médiu a zamražena v -70 °C. Také byl proveden výplach peritoneální dutiny pro získání makrofágů (podrobněji viz kapitola 3.4).

3.4 Aktivita makrofágů

Pro stanovení aktivity makrofágů bylo nezbytné sterilně vypláchnout peritoneální dutinu usmrcených myší. Pro snadnější manipulaci byla na pravé straně abdomenu rozvolněna kůže a skrze tukové těleso bylo pomocí stříkačky s jehlou (0,7×30 mm) do peritonea injikováno 10 ml na ledu vychlazeného kompletního média (RPMI 1640). Po mechanickém masírování břicha myši byla opět tato tekutina odebrána, přenesena do 15-ti ml zkumavky a stočena na centrifuze JOUAN (rotor S40, 8 min, 1200 rpm, 4 °C). Sediment byl resuspendován ve 3 ml kompletního RPMI a buňky byly spočteny na přístroji CountessTM Automated Cell Counter (Invitrogen), kdy k 10 μ l buněčné suspenze bylo přidáno 10 μ l trypanové modře a 10 μ l této směsi bylo přeneseno na speciální sklíčko a vloženo do měřicího přístroje. Nastavení parametrů přístroje bylo následující: velikost buněk (8-20), kulatost (80), citlivost (5). Zásobní roztok se zjištěnou koncentrací buněk byl naředěn pomocí kompletního RPMI na koncentraci 2×10^5 buněk/ml a byl nanášen na 96-ti jamkovou destičku (FALCON 30724-3072-0) v objemu 100 μ l/jamku (koncentrace na 1 jamku byla tedy 2×10^4 makrofágů). Buňky byly inkubovány ve 37 °C a 5% CO₂ po dobu 2 hod (což je doporučená doba

postačující k přisednutí makrofágů na dno jamky). Po 2 hodinách bylo odebráno médium s nepřisedlými buňkami, nahrazeno jednotlivými stimulanty a doplněno kompletním médiem na konečný objem 200 μ l. Jako stimulanty byly použity zhomogenizované sterilní slinné žlázy druhů *P. papatasi* nebo *P. dubosqi* ($\frac{1}{4}$ žlázy na jamku) - ať už samotné nebo v kombinaci s *Leishmania major* (2×10^5 promastigotů na jamku) či samotné leishmanie. Jako pozitivní kontrola sloužily makrofágy stimulované kombinací IFN- γ (25U/ml, AbD SEROTEC, PMP43A) a LPS (0,5 μ g/ml, Sigma, L4516), negativní kontrolou byly makrofágy ponechané bez stimulantů, pouze s RPMI 1640. Inkubace probíhala v termostatu (37 °C, 5% CO₂) po dobu 72 hodin.

3.4.1 NO – Griessova reakce

Aktivita enzymu iNOS byla zjišťována prostřednictvím stanovení produkce NO₂⁻ iontů, které jsou vedlejším produktem při přeměně substrátu L-argininu v L-citrulin a následném rozpadu NO v přítomnosti O₂ (v supernatantu makrofágů). Princip reakce je založen na působení Griessových činidel na NO₂⁻ ionty, které přeměňuje na růžové azosloučeniny, jež jsou následně fotometricky kvantifikovány.

Po 72 hodinách inkubace bylo z jednotlivých jamek odebráno 100 μ l supernatantu na destičku vhodnou pro měření optické density (COSTAR 9018). Jako standard byl použit 10 mM NaNO₂ ředěný dvojkovou řadou v rozmezí 100 μ M až 12,5 μ M.

Ke vzorkům i standardu bylo přidáno 50 μ l Griessova činidla A, které se nechalo 2 minuty inkubovat. Poté se přidalo 50 μ l činidla B. Po minimálně pěti minutách, kdy Griessova činidla zreagovala přímo s vyprodukovaným NO₂⁻, bylo možné měřit optickou densitu při 550 nm. Inkubace probíhaly ve tmě v pokojové teplotě.

Roztoky:

Kompletní RPMI = RPMI 1640 Hepes modification (Sigma R5886; w/25mM HEPES +NaHCO₃), penicilin 100 U/ml (Biotika), gentamicin 50 μ g/ml (GENTAMICIN LEK), glutamin - 2 mM (L-glu-L-ala, Sigma G-8541), 2-ME 50 μ M

Griessovo činidlo A = 58 mM sulfanilamid (Sigma S9251), 2,5% H₃PO₄, MilliQ

Griessovo činidlo B = 12 mM N-1-naftyletylendiamin dihydrochlorid (Sigma N9125), 2,5% H₃PO₄, MilliQ

Zásobní roztok standardu = 10 mM NaNO₂

3.4.2 Arginázová aktivita

Aktivita enzymu arginázy byla zjišťována v lyzátu makrofágů prostřednictvím stanovení produkce močoviny, která je vedlejším produktem při přeměně substrátu L-argininu v L-ornitin.

Makrofágy byly po odebrání supernatantu z jamek 30 minut lyzovány roztokem 0,1% Tritonu-X v kombinaci s proteázovými inhibitory (1 tableta na 10 ml roztoku, Complete Mini Roche, kat. č. 11836170001). Po uplynulé době bylo přidáno 100 μ l 25 mM Tris-HCl a vzorek o objemu 100 μ l byl následně přenesen do mikrozkušavek, kam bylo přidáno 10 μ l 10 mM MnCl_2 . Argináza byla aktivována zahříváním vzorku na 56 °C po dobu 10 min. Následně bylo přidáno 100 μ l 0,5 M argininu (substrátu), následovalo krátké stočení a inkubace na 2 hodiny v termostatu s 37 °C a 5% CO_2 . Reakce byla zastavena přidáním 400 μ l směsi kyselin v daném poměru (kyselina trihydrogenfosforečná a kyselina sírová) spolu s 20 μ l ISPF. Následovalo krátké stočení a inkubace po dobu 45 min při 100 °C. Poté se vzorky nechaly inkubovat ve tmě po dobu 10 min a v objemu 100 μ l byly přeneseny z mikrozkušavky na 96-ti jamkovou destičku vhodnou pro měření optické density (COSTAR 9018). Optická densita močoviny byla měřena při 540 nm.

Jako standard byla použita močovina o koncentraci 0,6 $\mu\text{g/ml}$, která byla dvojkovou řadou vyředěna až na koncentraci 0,004 $\mu\text{g/ml}$.

Roztoky:

25 mM Tris-HCl pH 7,5

0,1% Triton X (Fluka 93421)

Na 10 ml Tritonu-X se přidává 1 tableta inhibitorů (Complete Mini, Roche, ref: 1183617000)

10 mM MnCl_2

0,5 M L-arginin (Sigma A5006)

Močovina = 300 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma U-1250/Fluka 51459)

Zastavovací roztok = 23,2% H_3PO_4 , 8,7% H_2SO_4

ISPF = 552 mM α -isonitrosopropiophenon (Sigma I3502) v 100% etanolu

3.4.3 Stanovení protilátek a cytokinů

ELISA

(z anglického Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Tato metoda obecně slouží k detekci protilátek nebo samotného antigenu. Na sekundární protilátku je navázán enzym, který umožňuje vizualizaci vytvořeného komplexu antigen-protilátka.

V předložené diplomové práci bylo využito nepřímé ELISA metody ke stanovení protilátek proti slinám flebotomů (*P. papatasi*/*P. duboscqi*) a stanovení protilátek proti *L. major*, sandwich ELISA metody ke stanovení cytokinů. Protilátky byly stanoveny ze séra myši, množství cytokinů bylo stanoveno ze supernatantu makrofágů.

Stanovení protilátek proti slinám flebotomů

Jako antigen navázaný na mikrotitrační destičku byl použit homogenát slinných žláz *P. papatasi* nebo *P. duboscqi* v koncentraci 1/5 žlázy na jamku. Zhomogenizované slinné žlázy byly ředěny do navazovacího roztoku tak, aby byla ve 100 μ l obsažena 1/5 žlázy. Navazování antigenu probíhalo přes noc ve 4 °C.

Druhý den bylo provedeno promytí roztokem PBS-Tween pro odstranění přebytečného nenavázaného antigenu. Dále bylo nanášeno 6% mléko (Bio-Rad, kat. č. L1706404) ředěno v PBS-Tween sloužící k zablokování volných vazebných míst na destičce. Inkubace probíhala v 37 °C po dobu 45 minut. Po této době byla destička opět promyta a byla nanášena testovaná séra ředěná v 2% mléku v poměru 1:200. Protilátky byly stanoveny ze sér odebraných ve třech časových intervalech – před imunizací myši (preimunní séra), po 2. imunizaci sáním flebotomů a při usmrcení myši (9 týdnů po infekci). Inkubace probíhala v termostatu v 37 °C po dobu 90 minut. Po promytí byl nanášen konjugát (koží imunoglobuliny proti myšimu IgG značené peroxidázou, Serotec STAR 120P) ředěný v PBS-Tween v poměru 1:1000. Inkubace s konjugátem probíhala ve 37 °C po dobu 45 minut. Posledním krokem byla samotná vizualizace komplexu antigen-protilátka. Po promytí byl přidán substrátový roztok s ortho-fenylendiaminem (OPD) a peroxidem vodíku (H_2O_2). Reakce probíhala za tmy a byla zastavena 10% roztokem kyseliny sírové (H_2SO_4). Absorbance byla měřena na spektrometru při 492 nm (Tecan Infinite M200).

Stanovení protilátek proti antigenům *L. major* (LV561)

Jako antigen byli použiti celí promastigoti leishmanií, kteří byli dvakrát promyti fyziologickým roztokem a spočtení v Bürkerově komůrce. Mikrozkumavka se známým množstvím leishmanií byla zamražena (usmrcení leishmanií) a druhý den naředěna navazovacím roztokem na koncentraci 1×10^7 buněk/ml. Na jednu jamku připadl objem 100 μ l (tzn., že koncentrace leishmanií v jedné jamce byla 10^6 buněk). K navázání antigenu na povrch jamek docházelo po dobu 2 hodin ve 37 °C. Po odstranění nenavázaného antigenu byla volná vazebná místa na destičce zablokována přidáním 6% mléka ředěného v PBS/Tween (1 hodina ve 37 °C). Po opakovaném promytí byla nanесena séra ředěná do 2% mléka v poměru 1:400 a inkubace probíhala 1 hodinu ve 37 °C. Po promytí byl nanесen konjugát (kozí imunoglobuliny proti myšímu IgG značené peroxidázou, Serotec STAR 120P) ředěný v PBS-Tween v poměru 1:1000. Inkubace probíhala 1 hodinu ve 37 °C. Po uplynulé době a po opakovaném promytí mohlo dojít k vyvolání přidáním substrátového roztoku s OPD a H₂O₂. Reakce probíhala za tmy a byla zastavena 10% roztokem kyseliny sírové (H₂SO₄). Absorbance byla měřena na spektrometru při 492 nm.

Stanovení cytokinů

Metodou sandwich ELISA jsme měřili koncentraci cytokinů produkovaných makrofágy, které jsou typické jak pro prozánětlivou nebo protizánětlivou imunitní odpověď (přehled viz tabulka 2).

Metoda se liší od předchozích, výše zmíněných ELISA metod. Jedná se o princip tzv. „sandwichové“ metody, kdy je na mikrotitrační destičku navázána primární protilátka, která ze supernatantu vychytává antigen a proti němu je mířena sekundární - biotinem značená protilátka.

Na mikrotitrační destičku byla navázána primární protilátka v koncentraci 2 μ g/ml vychytávající ze supernatantu daný cytokin (tabulka č. 2). K navázání docházelo přes noc ve 4 °C.

Druhý den probíhalo promývání a blokování stejným způsobem jako u výše zmíněných ELISA metod, s tím rozdílem, že inkubační doba pro blokování byla 2 hodiny v pokojové teplotě. Po dalším promytí byly nanášeny neředěné vzorky supernatantu v objemu 100 μ l/jamku přes noc ve 4 °C.

Třetí den byl nanášen konjugát (biotinem značená sekundární protilátka) ředěný v PBS/Tween na koncentraci 2 μ g/ml. Takto nanесený konjugát byl inkubován 1 hodinu

v pokojové teplotě. Po uplynulé inkubační době a po promytí bylo možné přidat avidin-peroxidázu o koncentraci 500 µg/ml, která je důležitá pro vizualizaci komplexu antigen – protilátka. Avidin se váže na biotinem modifikovaný konec sekundární protilátky a připojí tak peroxidázu k vytvořenému komplexu. Přidaná avidin-peroxidáza byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Po uplynulé době následovalo opět promytí a vyvolání pomocí substrátového roztoku s OPD a H₂O₂. Reakce byla zastavena roztokem H₂SO₄ stejně jako u předchozích dvou metod.

Naměřené hodnoty jsme vyhodnocovali pomocí tzv. stimulačního indexu (SI), který byl dán poměrem mezi hodnotami absorbance daného vzorku a příslušné negativní kontroly. Tento přístup jsme použili vzhledem ke špatně zvolené kalibrační křivce a velké variabilitě naměřených hodnot mezi jednotlivými myšmi.

Tabulka č. 2 Stanovované cytokiny a jejich základní funkce, (Klein and Horejsi, 1997)

název cytokinu	typ cytokinu	funkce/produkce
TNF-α	prozánětlivý	hlavní produkt makrofágů a monocytů; aktivace endotelu okolních vlásečnic a jejich zvýšená propustnost, indukce místního zánětu
IL-12	prozánětlivý	produkován makrofágy; determinující faktor pro diferenciaci Th1
IL-10	protizánětlivý	Produkován především monocyty a makrofágy, inhibice funkce makrofágů a Th1 lymfocytů

Roztoky:

Navazovací roztok (karbonát-bikarbonát) = 20 mM Na₂CO₃ - NaHCO₃, pH 9,0 – 9,5

Promývací roztok = PBS + 0,05% Tween

PBS = 150 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 1 mM KH₂PO₄, pH - 7,2

Substrátový roztok = McIlwein fosfát-citrát, pH – 5,5, 0,11 M Na₂HPO₄ × 12 H₂O, 0,5 M kyselina citronová. Těsně před použitím přidat 5M OPD (ortho-fenylendiamin) a 0,03% H₂O₂

3.5 Izolace DNA a kvantifikace leishmanií

3.5.1 Izolace DNA

Pro účely předložené diplomové práce byla celková DNA vyizolována ze sleziny, jater, peritoneálních makrofágů, levého i pravého ucha a k nim příslušících spádových uzlin (kapitoly č. 3.3.3 a 3.4). Izolace DNA byla provedena podle předpisu výrobce komerčního kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). Jelikož bylo zpracováno několik různých orgánů/tkání odebraných z myši, byl tento předpis upraven podle potřeb.

Před samotnou izolací byly velké kusy tkání rozstříhány na menší kousky, uši a játra byly zhomogenizovány. Při homogenizaci bylo použito 400 μ l elučního pufru. Izolace DNA se dále u jednotlivých tkání/orgánů lišila v čase potřebném pro zlyzování tkáně (při 55 °C), v množství přidaného isopropanolu a v tom, zdali byl pro izolaci leishmaniové DNA použit celý orgán nebo pouze jeho část (tabulka č. 3). Posloupnost předpisu však byla striktně dodržena. Vyizolovaná DNA byla uložena do - 20 °C.

Tabulka č. 3: Úprava předpisu pro izolaci DNA u jednotlivých tkání/orgánů

orgán/tkáň	inkubace při 55 °C	ředění vzorku v elučním pufru	isopropanol
ucho	2 hodiny	ANO 20 μ l vzorku + 200 μ l	50 μ l
uzlina	3 hodiny	NE	100 μ l
slezina	2 hodiny	ANO 20 μ l vzorku + 200 μ l	50 μ l
makrofágy	1 hodina	NE	100 μ l
játra	2 hodiny	ANO 20 μ l vzorku + 200 μ l	50 μ l

3.5.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Tato metoda je založena na opakované replikaci úseku DNA, který je ohraničen specifickými primery pomocí Taq polymerázy (termostabilní DNA polymerázy) v procesu teplotního cyklování. Průběh reakce a vznik produktu je sledován prostřednictvím interkalační barvy (SYBER Green), kdy je fluorescence úměrná množství nově vznikající dvouřetězcové DNA (amplikonu). Kvantitativní PCR probíhá v cyclerech, které umožňují teplotní cyklování a detekci fluorescence v každém cyklu PCR. Výsledkem jsou amplifikační křivky, které vyobrazují danou fluorescenci náležící příslušnému cyklu.

Pro kvantifikaci leishmanií byla použita metoda SYBER Green (iQSYBER Green Supermix, Bio-Rad, Hercules, CA) probíhající na cycleru typu iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Amplifikovaný úsek kinetoplastové DNA byl vymezen pomocí primerů: „forward primer“ 5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG-3' a „reverse primer“ 5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3', které amplifikují úsek DNA dlouhý přibližně 70 bp. Pro samotnou reakci byl použit 1 µl vyizolované DNA, který byl nanášen v dubletech. Schéma teplotního cyklování bylo následující: 3 minuty při 95 °C, následovalo 45 opakujících se cyklů, 10 sekund při 95 °C, 10 sekund při 56 °C a nakonec 10 sekund při 72 °C (Myskova *et al.*, 2008). Kalibrace byla provedena v rozmezí 10¹ až 10⁶ leishmanií (spočteno pomocí Bürkerovy komůrky) ve směsi s jaterní tkání nenakažené myši. Tato tkáň (bez přidání leishmanií) sloužila také jako negativní kontrola.

Množství leishmanií v jednotlivých vzorcích bylo vyhodnoceno RNDr. J. Votýpkou prostřednictvím programu BioRad iQ5 Standard Edition v.2.0. Hodnoty použité ve statistické analýze odpovídají množství v celém odebraném vzorku tkáně (ucho, uzlina, slezina) či jeho příslušné poměrové části (játra, peritoneální výplach).

3.6 Pokusy na makrofágových liniích

3.6.1 Vymrazení makrofágů a kultivace

Pro účely této diplomové práce byly prováděny experimenty se dvěma liniemi makrofágů – J774 monocyto-makrofágová linie je odvozena z krevních makrofágů Balb/c myši imortalizovaných nádorovými buňkami (Sigma-aldrich), PMJ2-R linie makrofágů má původ v peritoneálních makrofázích C57BL/7 myši transformovaných J2 retrovirem (Adami *et al.*, 1993). Makrofágy uložené v kryobance jsou uchovávány ve speciálních mrazuvzdorných mikrozkuvkách naplněných médiem obsahujícím 5 – 10 % kryoprotektivní látku dimethylsulfoxid (www.sigmaaldrich.com). Po vymrazení jsou makrofágy sterilně přeočkovány do kultivačních nádob (Corning, 430168) s čerstvým médiem. Další pasážování je obvykle prováděno každý 5. - 7. den. Při přeočkování je nutné přisedlé makrofágy mechanicky odlepit od dna kultivační nádoby (oplachem). Makrofágy jsou uchovány v termostatu s 37 °C a 5% CO₂

Roztoky: Médium pro kultivaci makrofágů: RPMI 1640 Hepes modification (Sigma R5886; w/25mM HEPES +NaHCO₃), penicilin 100 U/ml (Biotika), gentamicin 50 µg/ml (GENTAMICIN LEK), glutamin - 2 mM (L-glu-L-ala Sigma G-8541), 2-ME 50 µM

3.6.2 Aktivita makrofágů

Makrofágy byly přeneseny do 15-ti ml zkumavky a stočeny na centrifuze JOUAN (rotor S40, 8 min, 1200 rpm, 4 °C). Sediment byl resuspendován ve 3 ml kompletního RPMI a buňky byly spočteny na přístroji CountessTM Automated Cell Counter (Invitrogen), (detailní postup viz kapitola č. 3.4). Zásobní roztok se zjištěnou koncentrací buněk byl naředěn pomocí kompletního RPMI na koncentraci 2×10^5 buněk/ml a byl nanášen na 96-ti jamkovou destičku (FALCON 30724-3072-0) v objemu 100 μ l/jamku (koncentrace na 1 jamku byla tedy 2×10^4 makrofágů). Buňky byly inkubovány ve 37 °C a 5% CO₂. Po 2 hodinách inkubace bylo odebráno médium s nepřisedlými buňkami a makrofágy byly stimulovány - IFN- γ (25U/ml, AbD SEROTEC, PMP43A) a LPS (0,5 μ g/ml, Sigma, L4516) v kombinaci se slinnými žlázami flebotomů a/nebo promastigoty leishmanií.

Jako stimulanty byly použity zhomogenizované sterilní slinné žlázy flebotomů druhů *P. papatasi*, *P. duboscqi*, *Lutzomyia longipalpis*, *P. orientalis*, *P. perniciosus*, *P. tobbi* v koncentraci $\frac{1}{4}$ nebo $\frac{1}{2}$ žlázy na jamku a promastigoty leishmanií druhů *L. major* a *L. infantum* v koncentraci 2×10^5 promastigotů na jamku. Makrofágy byly inkubovány se samotnými žlázami, samotnými leishmaniami nebo v následujících kombinacích: *L. major* se slinami *P. papatasi* nebo *P. duboscqi* či *L. infantum* se slinami *Lutzomyia longipalpis*, *P. orientalis*, *P. perniciosus* nebo *P. tobbi*. Jako pozitivní kontrola sloužily makrofágy stimulované kombinací IFN- γ (25U/ml, AbD SEROTEC, PMP43A) a LPS (0,5 μ g/ml, Sigma, L4516), negativní kontrolou byly makrofágy ponechané bez stimulantů, pouze s RPMI 1640. Inkubace probíhala v celkovém objemu 200 μ l v termostatu (37 °C, 5% CO₂) po dobu 72 hodin.

Aktivita makrofágů byla stanovena prostřednictvím produkce NO (klasicky aktivované makrofágy) a produkce močoviny (alternativně aktivované makrofágy) stejným způsobem jako je popsáno v kapitolách č. 3.4.1 a 3.4.2.

3.7 Statistické vyhodnocení

Pro analýzu výsledků byl použit statistický program NCSS 6.0.21.

Vyhodnocení vývoje leishmaniové léze v jednotlivých týdnech, kvantifikace leishmanií, protilátková odpověď myši proti *L. major*, produkce NO a močoviny, stanovení cytokinů či IgG protilátek proti slinám flebotomů v rámci jednoho odběru bylo stanoveno neparametrickým dvouvýběrovým testem Mann-Whitney U or Wilcoxon Rank Sum Test for Differences in Medians.

Celkový průběh křivek týkajících se vývoje leishmaniové léze byl testován pomocí GLM ANOVA a Tukey-Kramer testu.

Pro vyhodnocení IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* a *P. duboscqi* v rámci skupiny, avšak mezi jednotlivými odběry, byl použit neparametrický párový T-test – Wilcoxon Signed-Rank Test for Difference in Medians.

Korelační závislost byla zjišťována prostřednictvím neparametrického - Spearman Rank Correlation Matrix testu.

4. VÝSLEDKY

EXPERIMENTY NA MYŠÍM MODELU

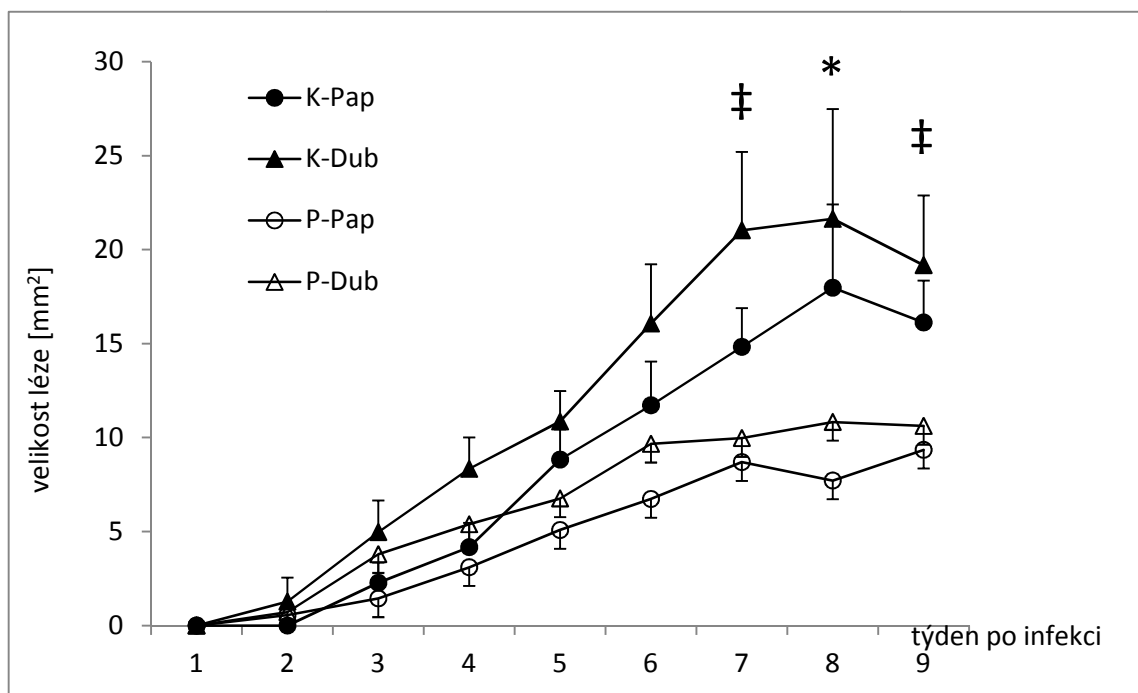
4.1 Vývoj infekce *Leishmania major*

Myši Balb/c byly rozděleny na dvě skupiny – kontrolní a imunizovanou (v textu označené jako **K** a **P**). Kontrolní skupina byla ponechána až do infekce *L. major* bez expozice flebotomům. Druhá skupina, imunizovaná, byla dvakrát vystavena sání neinfikovaných samic *P. papatasi*. Týden od poslední imunizace byly obě skupiny infikovány *L. major*, přičemž každá skupina byla dále rozdělena na dvě podskupiny. Jedna podskupina byla infikována *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. papatasi* (skupiny **K-Pap**, **P-Pap**) a druhá *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* (skupiny **K-Dub**, **P-Dub**). Myši byly infikovány intradermálně do pravého ušního boltce. Po infekci byly myši sledovány 9 týdnů.

Vývoj infekce způsobené *L. major* byl sledován prostřednictvím měření vzniklé kožní léze, kvantifikace leishmanií z odebraných tkání/orgánů a v neposlední řadě stanovením IgG protilátek proti samotným leishmaniím.

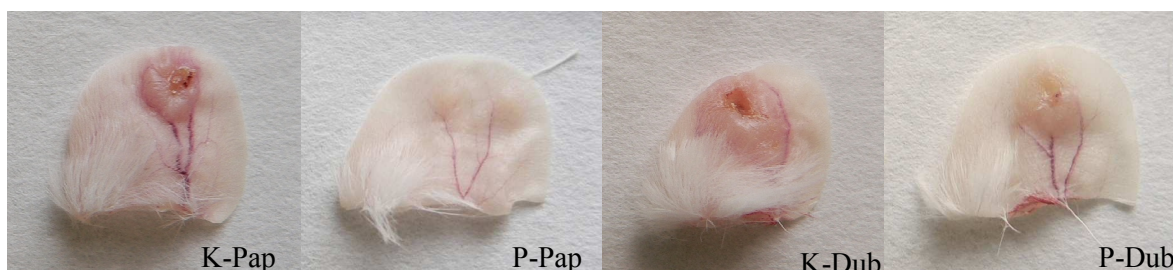
4.1.1 Vývoj leishmaniové léze

U kontrolní skupiny dosahovala velikost lézí větších rozměrů než u myší imunizovaných sáním flebotomů *P. papatasi*. Tohoto výsledku bylo dosaženo u obou podskupin (graf č. 1, obrázek č. 1). Mezi skupinami K-Dub a P-Dub byl signifikantní rozdíl ve velikosti léze sedmý ($p = 0,018$) a devátý ($p = 0,048$) týden po infekci, mezi skupinami K-Pap a P-Pap to bylo v osmém týdnu po infekci ($p = 0,048$). Mezi imunizovanými či kontrolními skupinami nebyly pozorovány signifikantní rozdíly (graf č. 1).



Graf č. 1: Vývoj lézí *L. major* u myší Balb/c po dobu 9 týdnů

Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve velikosti léze mezi skupinou K-Pap a P-Pap. Symbolem ‡ je vyznačen signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) ve velikosti léze mezi skupinou K-Dub a P-Dub.



Obrázek č. 1: Vybrané infikované uši myší Balb/c (9. týden po infekci)

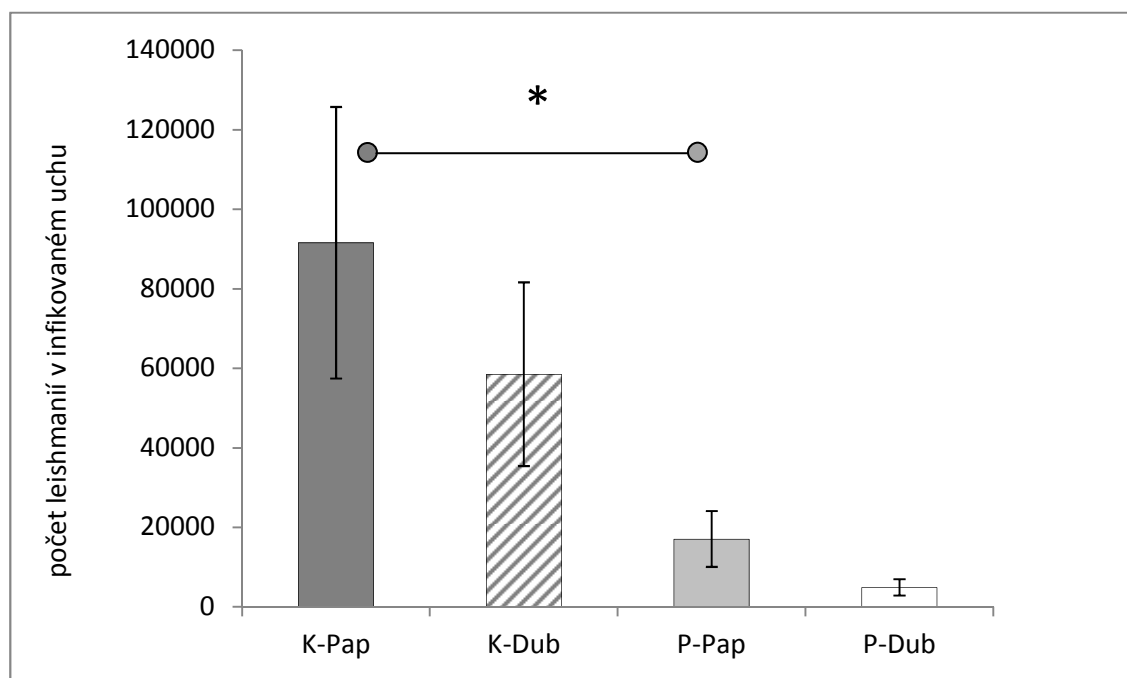
4.1.2 Kvantifikace leishmanií v orgánech /tkáních myší Balb/c

Izolace DNA byla provedena z obou uší, příslušných spádových uzlin, ze sleziny, jater a peritoneálních makrofágů odebraných 9. týden po infekci.

Levé ucho, játra a slezina byly negativní na přítomnost leishmaniové DNA u všech testovaných myší. Levá uzlina byla pozitivní pouze u dvou myší (obě myši byly ze skupiny K-Dub, počet leishmanií byl 28 a 53 leishmanií/tkáň). U makrofágů bylo pozitivních sedm myší z 28 testovaných. Tyto myši byly zahrnuty ve všech 4 skupinách a počet leishmanií v makrofázích se pohyboval v rozmezí 3 - 102.

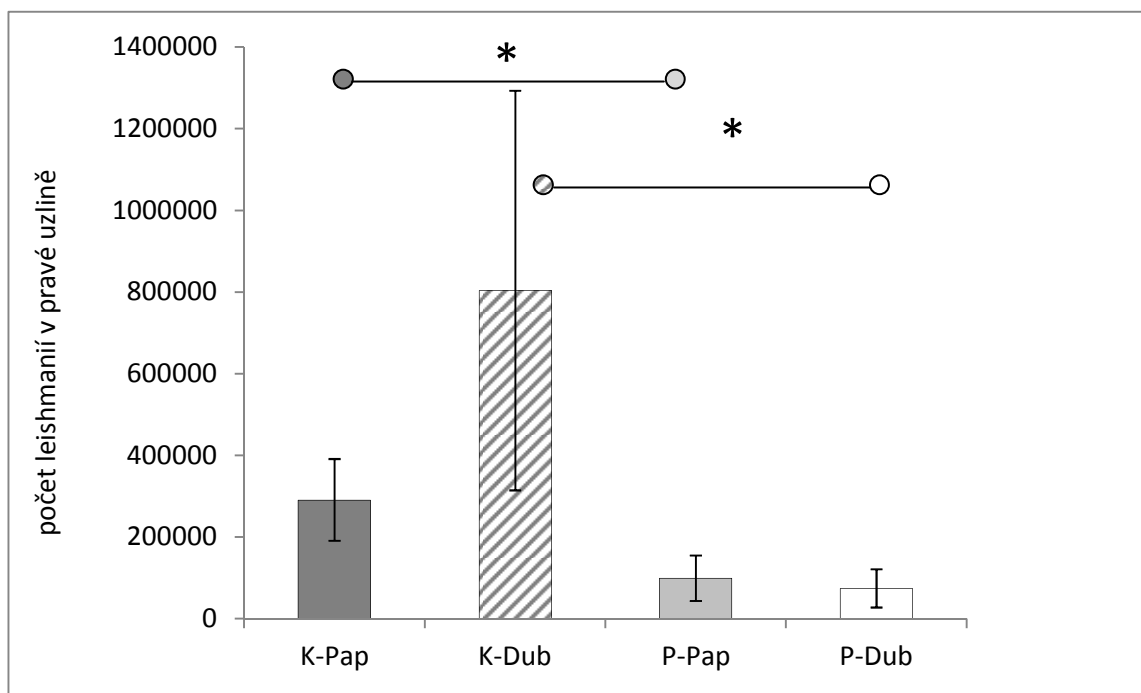
Nejvíce infikovanými tkáněmi byly pravé ucho a k němu náležící spádová uzlina (graf č. 2 a 3). U obou kontrolních skupin byl zaznamenán znatelně vyšší počet leishmanií než u skupin imunizovaných a to jak v infikovaném uchu, tak ve spádové uzlině. Rozdíl mezi skupinami K-Pap a P-Pap byl statisticky průkazný u obou výše zmíněných tkání (ucho: $p = 0,035$, uzlina: $p = 0,048$). Infikované ucho kontrolní skupiny obsahovalo $5,4 \times$ více leishmanií než ucho skupiny imunizované. V případě pravé spádové uzliny bylo množství leishmanií u kontrolní skupiny $3 \times$ vyšší než u skupiny imunizované. Mezi skupinami K-Dub a P-Dub byl signifikantní rozdíl v počtu leishmanií v uzlině ($p = 0,010$), zatímco výsledky týkající se ucha se pohybovaly těsně nad hranicí signifikance ($p = 0,064$). Pravá spádová uzlina kontrolní skupiny obsahovala v tomto případě $10,8 \times$ více leishmanií než uzlina imunizované skupiny.

Mezi oběma imunizovanými či kontrolními skupinami nebyly pozorovány signifikantní rozdíly (K-Dub x K-Pap, ucho: $p = 0,406$, uzlina: $p = 0,475$; P-Dub x P-Pap, ucho: $p = 0,565$, uzlina: $p = 0,949$).



Graf č. 2: Kvantifikace leishmanií v infikovaném uchu

Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v množství detekovaných leishmanií mezi skupinami ($p < 0,05$).



Graf č. 3: Kvantifikace leishmanií v pravé spádové uzlině

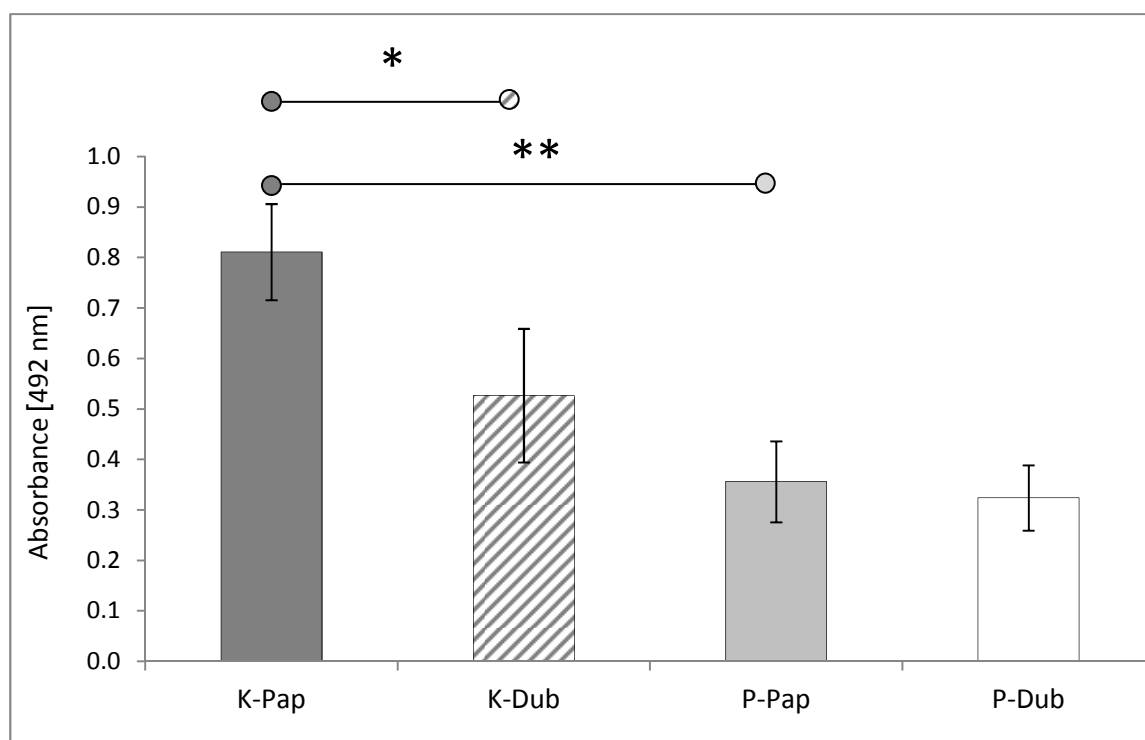
Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v množství detekovaných leishmanií mezi skupinami ($p < 0,05$).

Korelační analýzou byla prokázána pozitivní závislost mezi velikostí léze měřené 9. týden po infekci a počtem leishmanií v infikovaném uchu. Korelační koeficient (ρ) byl 0,781, $p = 0,000001$. Zároveň byla pozitivní závislost i mezi množstvím leishmanií v infikovaném uchu a k němu náležící spádové uzlině; $\rho = 0,381$, $p = 0,0499$.

4.1.3 Protilátková odpověď myši Balb/c proti *L. major*

Protilátky třídy IgG proti *L. major* byly detekovány z myšího séra získaného 9. týden po infekci.

Obě kontrolní skupiny vykazovaly vyšší hladiny IgG protilátek v porovnání k nim příslušným imunizovaným skupinám. Rozdíl v produkci protilátek byl však statisticky průkazný pouze mezi skupinami infikovanými v přítomnosti slinných žláz *P. papatasi* (K-Pap x P-Pap, $p = 0,004$). Mezi oběma kontrolními skupinami byl také zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci protilátek, kdy skupina K-Pap produkovala více IgG než skupina K-Dub ($p = 0,048$). Naproti tomu, mezi skupinou infikovanou v přítomnosti slinných žláz *P. duboscqi* a k ní náležící skupinou kontrolní nebyly pozorovány signifikantní rozdíly (K-Dub a P-Dub, $p = 0,18$), stejně jako mezi oběma pokusnými skupinami (P-Dub a P-Pap, $p = 0,75$) (graf č. 4).



Graf č. 4: Anti-*Leishmania major* IgG

Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci protilátek proti *L. major* mezi skupinami (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Korelační analýzou byla prokázána pozitivní korelace mezi množstvím IgG protilátek proti *L. major* a počtem leishmanií v uchu; $\rho = 0,619$, $p = 0,0004$. Množství protilátek zároveň korelovalo s velikostí léze; $\rho = 0,583$, $p = 0,001$.

4.2 Aktivita makrofágů

Aktivita makrofágů získaných z peritoneálního výplachu 9. týden po infekci byla stanovena pomocí produkce NO (klasicky aktivované makrofágy), močoviny (alternativně aktivované makrofágy) a cytokinů. Získané makrofágy byly stimulované *ex vivo* homogenátem slinných žláz obou druhů flebotomů a/nebo leishmaniemi.

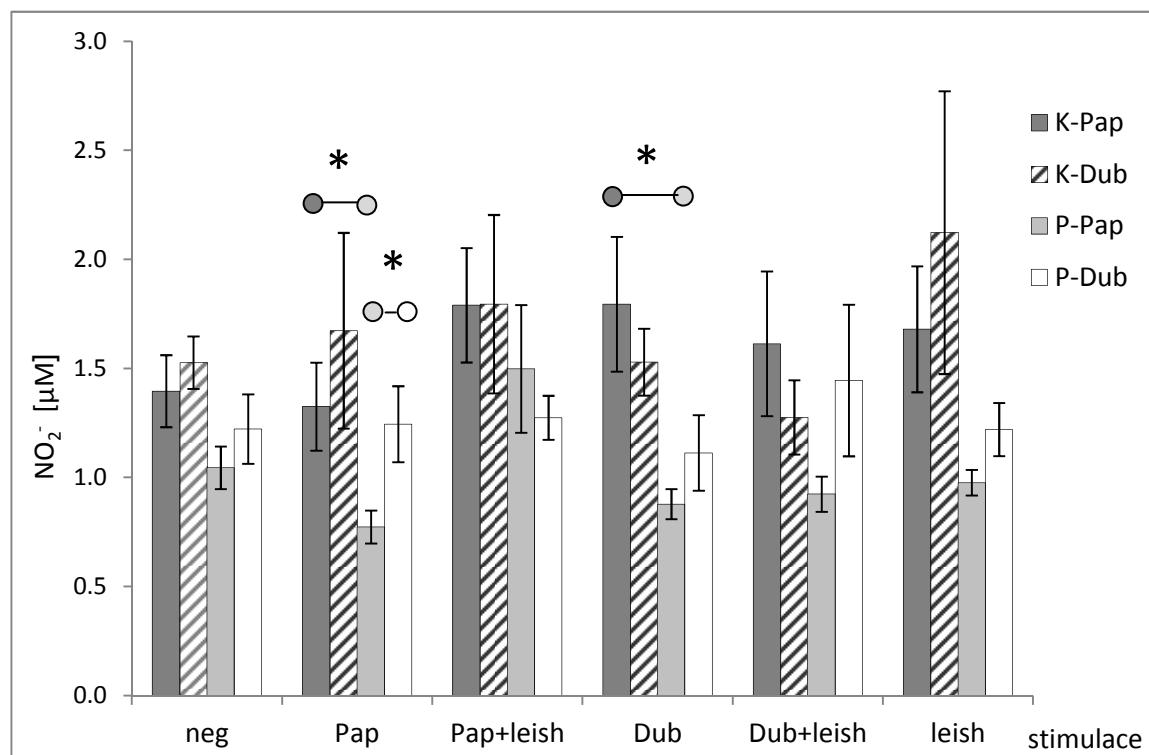
4.2.1 Produkce NO

Produkce NO byla stanovena ze supernatantu makrofágů odebraného po 72 hodinách inkubace. Výsledky jsou shrnuty v grafu číslo 5.

Mezi kontrolní a imunizovanou skupinou myší infikovaných v přítomnosti slin *P. papatasi* byl zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci NO po stimulaci homogenátem

slinných žláz *P. papatasi* ($p = 0,018$) i *P. duboscqi* ($p = 0,025$). Kontrolní skupina produkovala $1,7\times$ více NO při stimulaci slinnýma žlázama *P. papatasi* a $2\times$ více při stimulaci slinnýma žlázama *P. duboscqi* v porovnání se skupinou imunizovanou. Mezi kontrolní a imunizovanou skupinou, které byly infikovány v přítomnosti slin *P. duboscqi*, nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v produkci NO nezávisle na použité stimulaci.

Signifikantní rozdíl v produkci NO byl dále zaznamenán mezi imunizovanými skupinami P-Pap a P-Dub, a to v případě stimulace makrofágů homogenátem slinných žláz *P. papatasi* ($p = 0,013$). Makrofágy skupiny P-Dub vyprodukovaly $1,6\times$ více NO než makrofágy skupiny P-Pap. Mezi kontrolními skupinami v rámci obou druhů flebotomů nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v produkci NO při použití jakékoliv stimulace.



Graf č. 5: Produkce NO

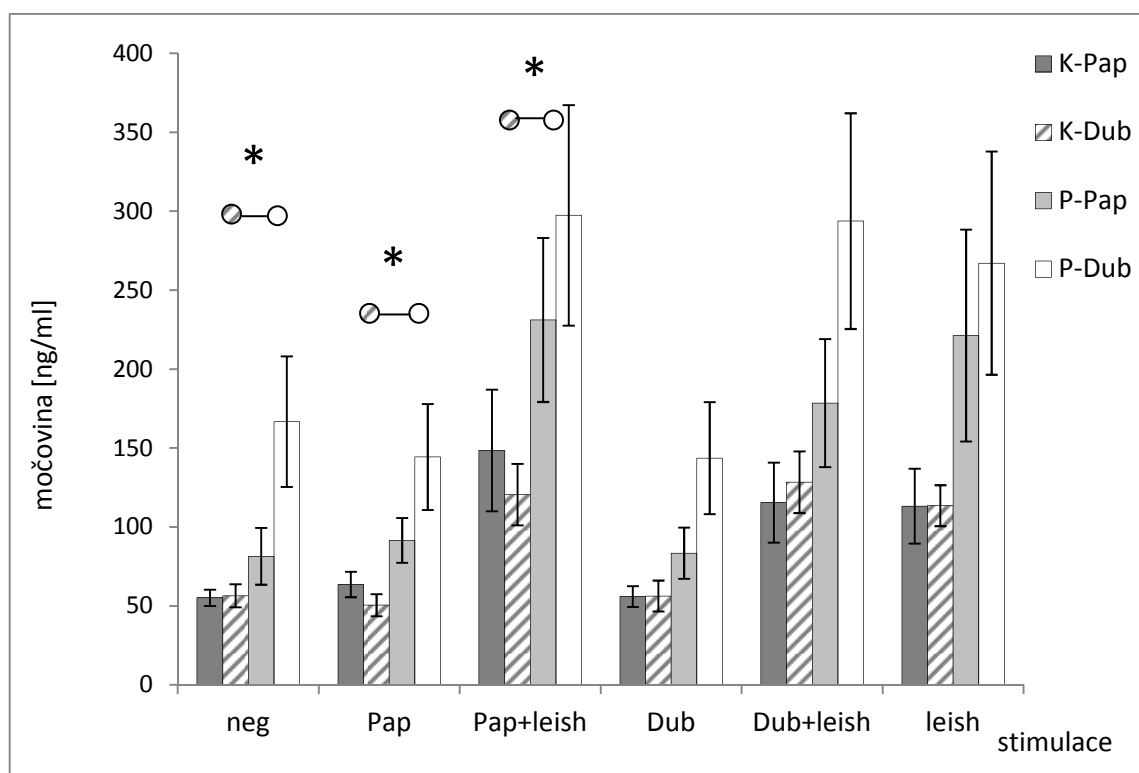
Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé stimulace makrofágů: neg = negativní kontrola, Pap = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, Pap+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, Dub = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, Dub+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, leish = stimulace promastigoty *L. major* (detailní metodika viz kapitola 3.4). Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci NO mezi jednotlivými skupinami ($p < 0,05$).

4.2.2 Produkce močoviny

Produkce močoviny byla stanovena z lyzátu makrofágů, které byly inkubovány s přidávanými stimulanty po dobu 72 hodin.

Signifikantní rozdíl v produkci močoviny byl zaznamenán pouze mezi skupinami K-Dub a P-Dub a to jak v rámci negativní kontroly ($p = 0,025$), tak při stimulacích makrofágů homogenátem slinných žláz *P. papatasi* ($p = 0,018$) či homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major* ($p = 0,048$). Kontrolní skupina přitom ve všech případech produkovala méně močoviny v porovnání se skupinou imunizovanou.

Změny v produkci močoviny se nelišily mezi kontrolními a imunizovanými skupinami infikovaných v přítomnosti slin *P. papatasi* (K-Pap x P-Pap) ani mezi oběma pokusnými a kontrolními skupinami (K-Pap x K-Dub, P-Pap x P-Dub) při použití jakékoliv stimulace (graf č. 6).



Graf č. 6: Produkce močoviny - arginázoová aktivita

Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé stimulace makrofágů: neg = negativní kontrola, Pap = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, Pap+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, Dub = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, Dub+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* v kombinaci s promastigoty

L. major, leish = stimulace promastigoty *L. major* (detailní metodika viz kapitola 3.4). Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci močoviny mezi skupinami, ($p < 0,05$)

V předchozích dvou grafech nejsou zahrnuty pozitivní stimulace makrofágů z důvodu grafické úpravy. V tabulce č. 1 je proto uvedeno číselné porovnání pozitivních a negativních kontrol.

Tabulka 1: Hodnoty pozitivních a negativních kontrol v rámci měření produkce NO a močoviny; hodnoty jsou ve tvaru: průměr \pm střední chyba průměru

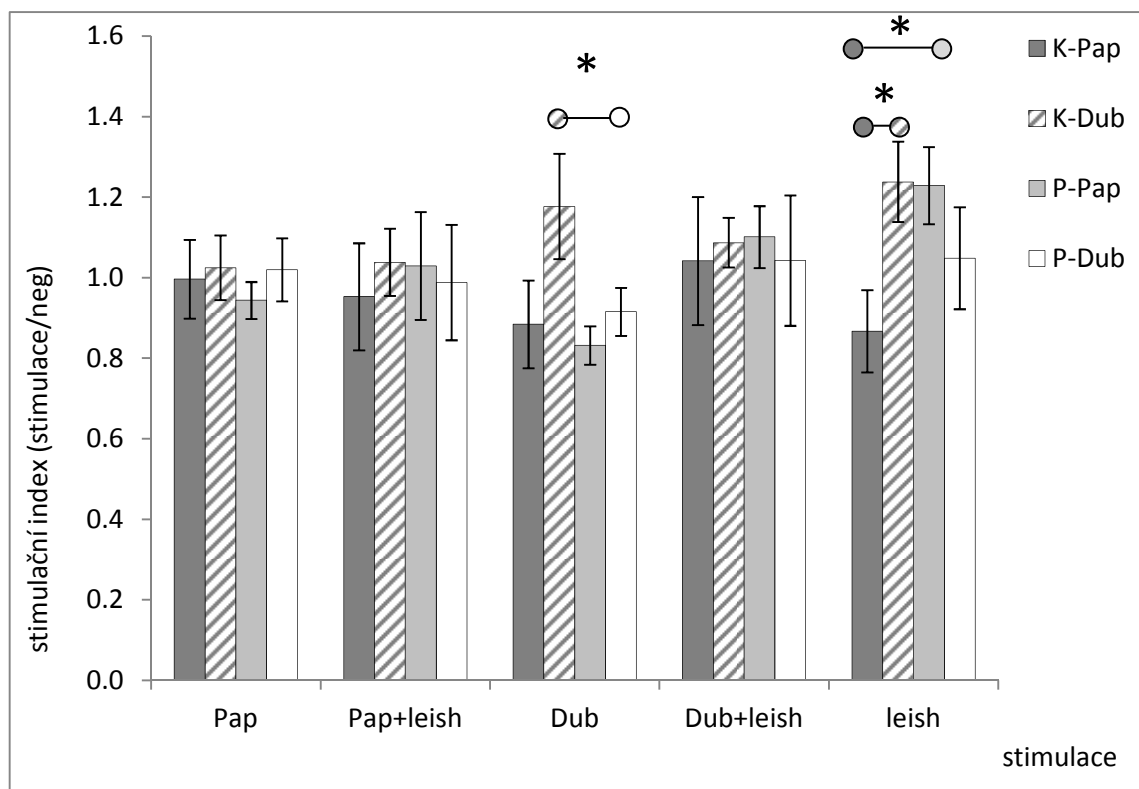
Skupina	NO [μ M]		močovina [ng/ml]	
	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní
K-Pap	1,4 \pm 0,2	12,4 \pm 3,5	55,1 \pm 5,1	128,7 \pm 28,5
K-Dub	1,5 \pm 0,1	6,8 \pm 2,1	56,4 \pm 7,3	78,8 \pm 7,0
P-Pap	1,0 \pm 0,1	9,2 \pm 2,8	81,4 \pm 17,9	163,3 \pm 37,9
P-Dub	1,2 \pm 0,2	14,9 \pm 4,9	166,7 \pm 41,4	241,6 \pm 58,4

4.2.3 Stanovení cytokinů

Aktivita makrofágů byla také studována podle produkce cytokinů. Ze supernatantu byly stanoveny cytokiny prozánětlivé (TNF- α , IL-12) i protizánětlivé (IL-10).

TNF- α

Mezi kontrolní a imunizovanou skupinou myší, které byly infikovány v přítomnosti slin *P. duboscqi*, byl zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci TNF- α při stimulaci homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* ($p = 0,048$) (graf č. 7). Kontrolní skupina produkovala v tomto případě více TNF- α než skupina imunizovaná. Po stimulaci makrofágů promastigoty *L. major* byla signifikantně zvýšena produkce TNF- α u skupiny imunizované a infikované v přítomnosti slin *P. papatasi* (P-Pap) v porovnání se skupinou kontrolní (K-Pap) ($p = 0,035$). Mezi kontrolními skupinami v rámci obou druhů flebotomů byl po stimulaci promastigoty *L. major* taktéž zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci tohoto cytokinu ($p = 0,035$). Mezi oběma pokusnými skupinami (P-Pap x P-Dub) nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v produkci tohoto cytokinu (graf č. 8).

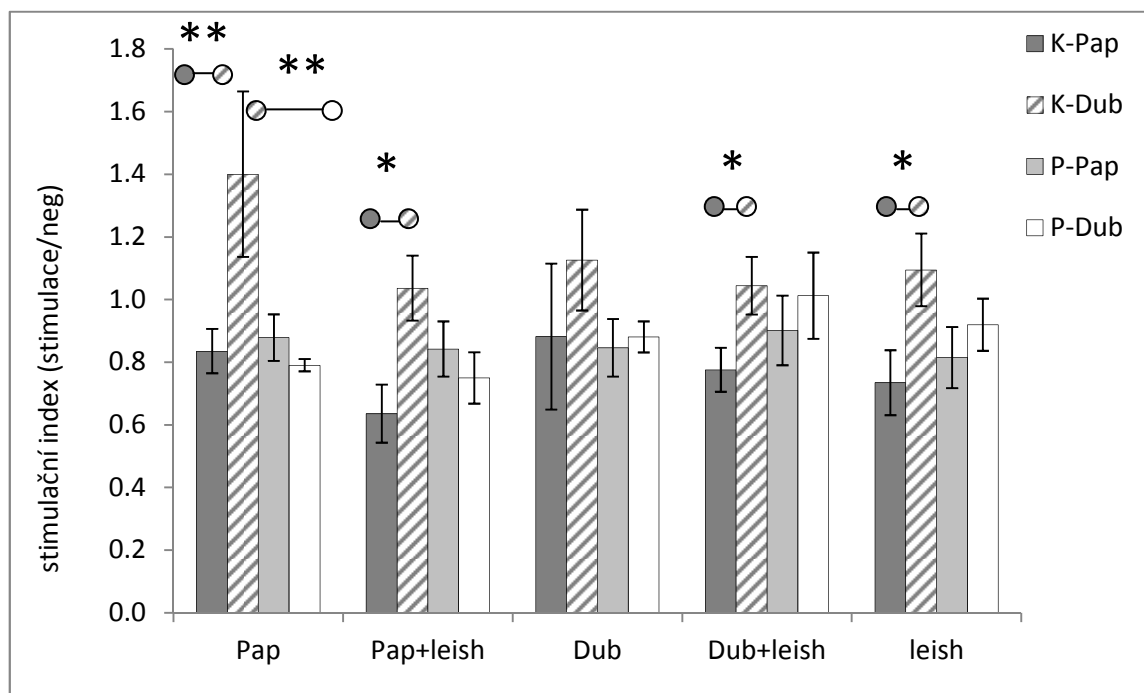


Graf č. 7: Produkce TNF- α

Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé stimulace makrofágů: neg = negativní kontrola, Pap = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, Pap+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, Dub = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, Dub+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, leish = stimulace promastigoty *L. major* (detailní metodika viz kapitola 3.4). Produkce cytokinů je vyjádřena pomocí stimulačního indexu, kdy naměřené hodnoty absorbancí byly vztaženy vůči příslušné negativní kontrole. Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci TNF- α mezi skupinami, * ($p < 0,05$).

IL-12

Kontrolní skupina infikovaná v přítomnosti slin *P. duboscqi* produkovala vyšší množství IL-12 než příslušná imunizovaná skupina, a to při stimulaci homogenátem slinných žláz *P. papatasi* ($p = 0,002$) (graf č. 8). Statisticky průkazný rozdíl byl dále mezi skupinami kontrolními (K-Pap, K-Dub) po stimulaci homogenátem slinných žláz *P. papatasi* ($p = 0,006$), homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s *L. major* ($p = 0,025$), homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* v kombinaci s *L. major* ($0,035$) a po stimulaci samotnými leishmanii ($p = 0,025$). Nebyl pozorován rozdíl v produkci IL-12 mezi oběma imunizovanými skupinami (P-Pap x P-Dub) ani mezi skupinami infikovanými v přítomnosti slin *P. papatasi* (K-Pap x P-Pap) (graf č. 8).

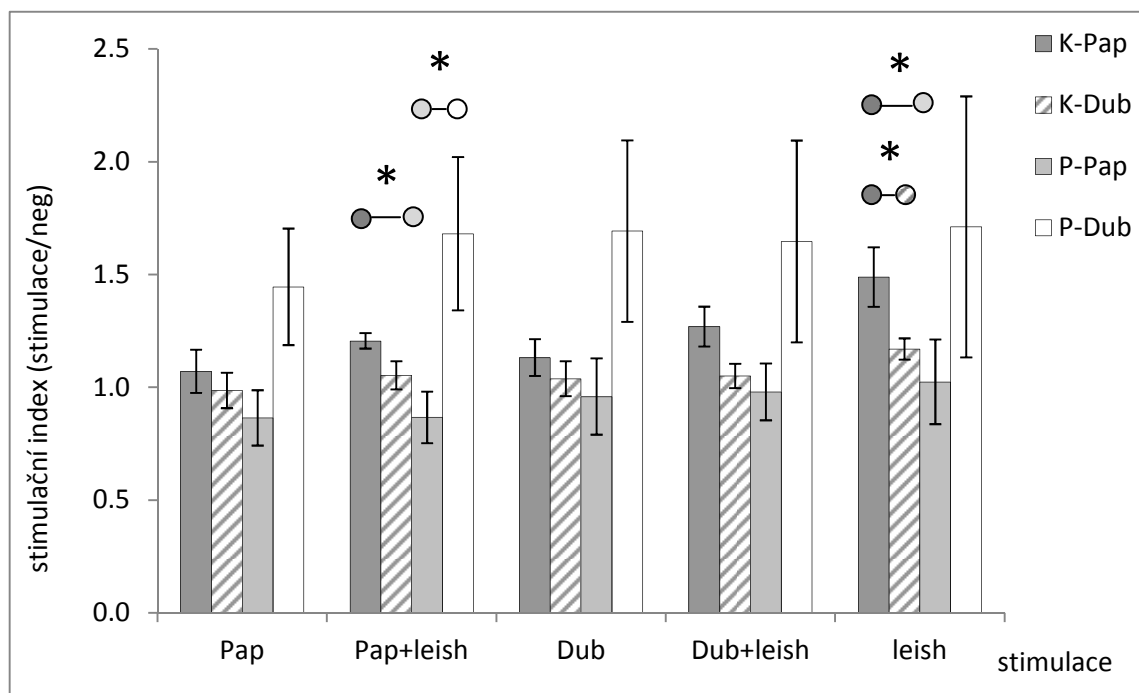


Graf č. 8: Produkce IL-12

Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé stimulace makrofágů: neg = negativní kontrola, Pap = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, Pap+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, Dub = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, Dub+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, leish = stimulace promastigoty *L. major* (detailní metodika viz kapitola 3.4). Produkce cytokinů je vyjádřena pomocí stimulačního indexu, kdy naměřené hodnoty absorbancí byly vztaženy vůči příslušné negativní kontrole. Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci IL-12 mezi skupinami, * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

IL-10

Signifikantní rozdíl v produkci IL-10 byl zaznamenán mezi kontrolními a imunizovanými skupinami infikovanými v přítomnosti slin *P. papatasi* při stimulaci homogenátem slinných žláz *P. papatasi* s promastigoty *L. major* ($p = 0,013$) a při stimulaci samotnými promastigoty ($p = 0,035$) (graf č. 9). Kontrolní skupina (K-Pap) produkovala v obou případech více tohoto cytokinu než skupina imunizovaná (P-Pap). Statisticky průkazný rozdíl v produkci tohoto cytokinu byl zaznamenán i mezi oběma skupinami kontrolními (K-Pap, K-Dub) po stimulaci promastigoty *L. major* ($p = 0,025$) a dále mezi skupinami imunizovanými (P-Pap, P-Dub) po stimulaci homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major* ($p = 0,035$). Skupiny kontrolních a imunizovaných myší infikovaných v kombinaci se slinami *P. duboscqi* se nelišily v produkci IL-10 (graf č. 9).



Graf č. 9: Produkce IL-10

Na ose x jsou vyznačeny jednotlivé stimulace makrofágů: neg = negativní kontrola, Pap = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, Pap+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, Dub = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, Dub+leish = stimulace homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* v kombinaci s promastigoty *L. major*, leish = stimulace promastigoty *L. major* (detailní metodika viz kapitola 3.4). Produkce cytokinů je vyjádřena pomocí stimulačního indexu, kdy naměřené hodnoty absorbancí byly vztaženy vůči příslušné negativní kontrole. Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci IL-10 mezi skupinami, * ($p < 0,05$).

V grafech pro stanovení jednotlivých cytokinů nejsou zahrnuty pozitivní stimulace makrofágů z důvodu grafické úpravy. V tabulce č. 2 je proto uvedeno číselné porovnání pozitivních a negativních kontrol.

Tabulka 2: Hodnoty pozitivních a negativních kontrol v rámci měření produkce jednotlivých cytokinů; hodnoty jsou ve tvaru: průměr stimulačního indexu \pm střední chyba průměru

skupina	TNF- α		IL-12		IL-10	
	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní	negativní	pozitivní
K-Pap	0,3 \pm 0,0	7,1 \pm 3,5	0,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	1,7 \pm 0,2
K-Dub	0,2 \pm 0,0	7,7 \pm 2,8	0,2 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	1,5 \pm 0,2
P-Pap	0,3 \pm 0,0	8,0 \pm 1,5	0,4 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	1,6 \pm 0,3
P-Dub	0,4 \pm 0,1	6,4 \pm 2,2	0,4 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2

4.3 Protilátková odpověď myši Balb/c proti slinám *P. papatasi* a *P. duboscqi*

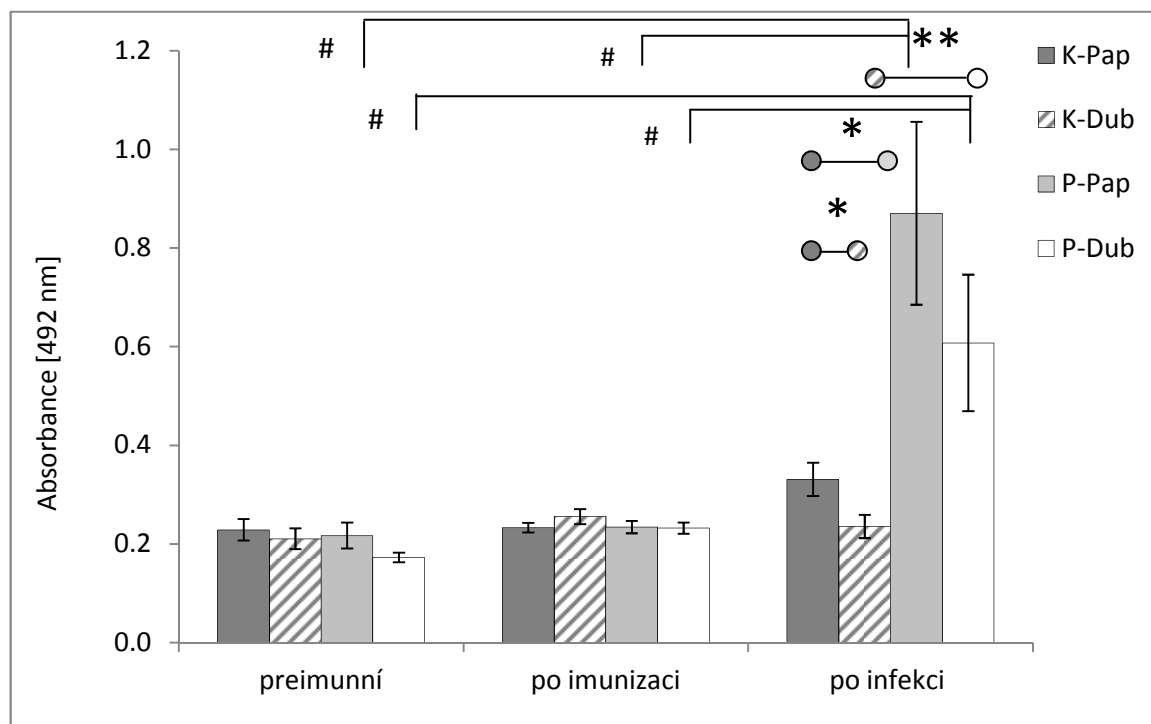
Protilátky třídy IgG proti slinám flebotomů *P. papatasi* a *P. duboscqi* byly detekovány z myšího séra odebraného ve 3 obdobích – před imunizací myší, po poslední imunizaci a 9. týden po infekci.

Anti-*P. papatasi* IgG

Hladiny IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* u preimunního séra a u séra získaného po imunizaci se nelišily mezi skupinami. V rámci posuzovaných skupin se rozdílné hladiny těchto protilátek objevovaly pouze v kombinacích: preimunní séra x séra odebraná 9. týden po infekci a séra odebraná po imunizaci x séra získaná 9. týden po infekci. Obě imunizované skupiny (P-Pap, P-Dub), vykazovaly vyšší hladiny IgG protilátek 9. týden po infekci oproti preimunnímu séru i vzorkům získaných po imunizaci.

Imunizovaná skupina infikovaná s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* (P-Dub) produkovala více anti-*P. papatasi* IgG oproti preimunnímu séru ($p = 0,018$) i séru získanému po imunizaci ($p = 0,018$). Stejně tomu bylo u skupiny infikované s homogenátem slinných žláz *P. papatasi* (P-Pap) s následujícími pravděpodobnostmi - $p = 0,028$ a $p = 0,018$.

V séru odebraném po infekci vykazovaly obě imunizované skupiny vyšší hladiny IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* v porovnání k nim příslušným kontrolním skupinám. Rozdíl v produkci protilátek proti *P. papatasi* byl statisticky průkazný mezi skupinou imunizovanou sáním flebotomů a skupinou kontrolní v rámci jednoho druhu flebotoma (K-Pap x P-Pap: $p = 0,018$, K-Dub x P-Dub: $p = 0,006$). Statisticky průkazný rozdíl byl také mezi oběma kontrolními skupinami, přičemž K-Pap produkoval více protilátek než K-Dub ($p = 0,013$). Mezi imunizovanými skupinami nebyl rozdíl v produkci anti-*P. papatasi* IgG protilátek (graf č. 10).



Graf č. 10: IgG protilátky proti slinám *P. papatasi*

Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* mezi skupinami, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Symbolem # je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci těchto protilátek mezi jednotlivými odběry v rámci skupiny, $p < 0,05$.

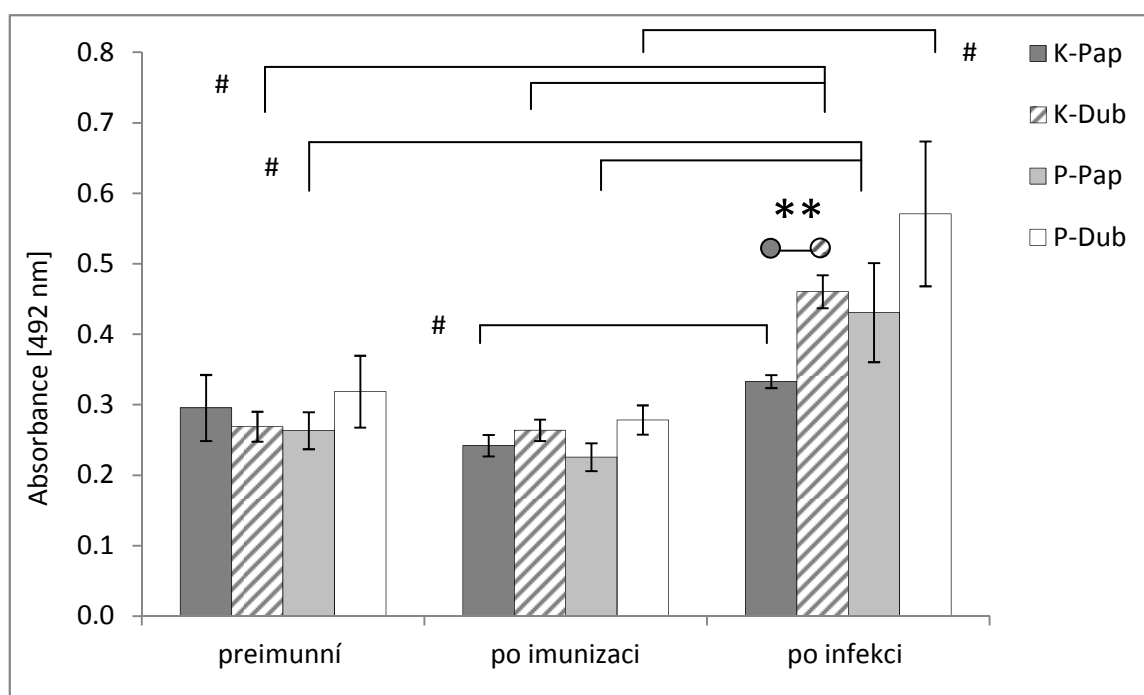
Anti-*P. duboscqi* IgG

Hladiny IgG protilátek (anti-*P. duboscqi*) u preimunního séra a u séra získaného po imunizaci se nelišily mezi skupinami. V rámci posuzovaných skupin se rozdílné hladiny těchto protilátek objevovaly pouze v kombinacích: preimunní séra x séra odebraná 9. týden po infekci a séra odebraná po imunizaci x séra získaná 9. týden po infekci. V tomto případě se však nejednalo pouze o imunizované skupiny, jako tomu bylo u anti-*P. papatasi* protilátek, ale také o skupiny kontrolní. Trend vyšší produkce IgG protilátek v 9. týdnu po infekci u imunizovaných skupin vůči kontrolním skupinám byl zachován i v tomto případě.

Imunizovaná skupina infikovaná homogenátem slinných žláz *P. papatasi* se lišila v produkci anti-*P. duboscqi* protilátek v obou případech – preimunní x po infekci ($p = 0,028$); po imunizaci x po infekci ($p = 0,018$). U imunizované skupiny infikované homogenátem slinných žláz *P. duboscqi* byl signifikantní rozdíl pouze mezi séry po imunizaci x po infekci ($p = 0,028$). Kontrolní skupina K-Pap produkovala signifikantně více těchto protilátek v 9.

týdnu po infekci v porovnání s hladinou protilátek v séru získaném po imunizaci ($p = 0,018$). Skupiny K-Dub se lišila v obou případech – preimunní x po infekci ($p = 0,018$); po imunizaci x po infekci ($p = 0,018$).

Rozdíl v produkci protilátek proti slinám *P. duboscqi* v 9. týdnu po infekci byl statisticky průkazný pouze v rámci kontrolních skupin ($p = 0,003$), kdy skupina K-Dub produkovala více IgG protilátek než skupina K-Pap. V případě imunizovaných skupin nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v produkci těchto protilátek, avšak trend vyšší produkce IgG u skupiny infikované *L. major* v kombinaci s homogenátem *P. duboscqi* byl zachován (v porovnání se skupinou P-Pap).



Graf č. 11: IgG protilátky proti slinám *P. duboscqi*

Symbolem * je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci IgG protilátek proti slinám *P. duboscqi* mezi skupinami, ** $p < 0,01$.

Symbolem # je vyznačen signifikantní rozdíl v produkci těchto protilátek mezi jednotlivými odběry v rámci skupiny, $p < 0,05$

Korelační analýzou byla prokázána negativní závislost mezi množstvím IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* a počtem leishmanií ve spádové uzlině náležící infikovanému uchu. ($\rho = -0,548$, $p = 0,003$). Stejný vztah byl zaznamenán mezi množstvím těchto protilátek a velikostí léze ($\rho = -0,406$, $p = 0,032$). Naproti tomu nebyla prokázána žádná závislost mezi hladinami protilátek proti slinám *P. duboscqi* a množstvím leishmanií v tkáních/orgánech či velikostí léze.

EXPERIMENTY NA MAKROFÁGOVÝCH LINIÍCH

Druhou částí předložené diplomové práce byly *in vitro* experimenty prováděné na liniích makrofágů, které byly získané ze dvou kmenů myší s odlišnou vnímavostí k leishmaniové infekci. J774 makrofágy pocházejí z kmene myší citlivých k leishmanióze (Balb/c) a makrofágy PMJ2-R pocházejí z rezistentních myší (C57BL/6). Byl porovnáván vliv slin flebotomů na aktivitu makrofágů mezi oběma výše zmíněnými buněčnými liniemi a mezi testovanými druhy flebotomů.

Makrofágy byly stimulované homogenátem slinných žláz, leishmanii nebo kombinací obou faktorů. Při stimulacích leishmanii, ať už samotnými nebo v kombinaci s homogenátem slinných žláz, byly použity dva druhy leishmanií v závislosti na druhu flebotoma. Pro zástupce vektorů přenášejících kožní leishmaniózu byl použit kmen *L. major*, pro zástupce vektorů přenášejících viscerální leishmaniózu byla použita *L. infantum*.

Aktivita makrofágů byla stanovena pomocí produkce NO (klasicky aktivované makrofágy) a pomocí produkce močoviny (alternativně aktivované makrofágy). Produkce NO byla stanovena ze supernatantu makrofágů odebraného po 72 hodinách inkubace, zatímco produkce močoviny byla stanovena z lyzátu těchto makrofágů.

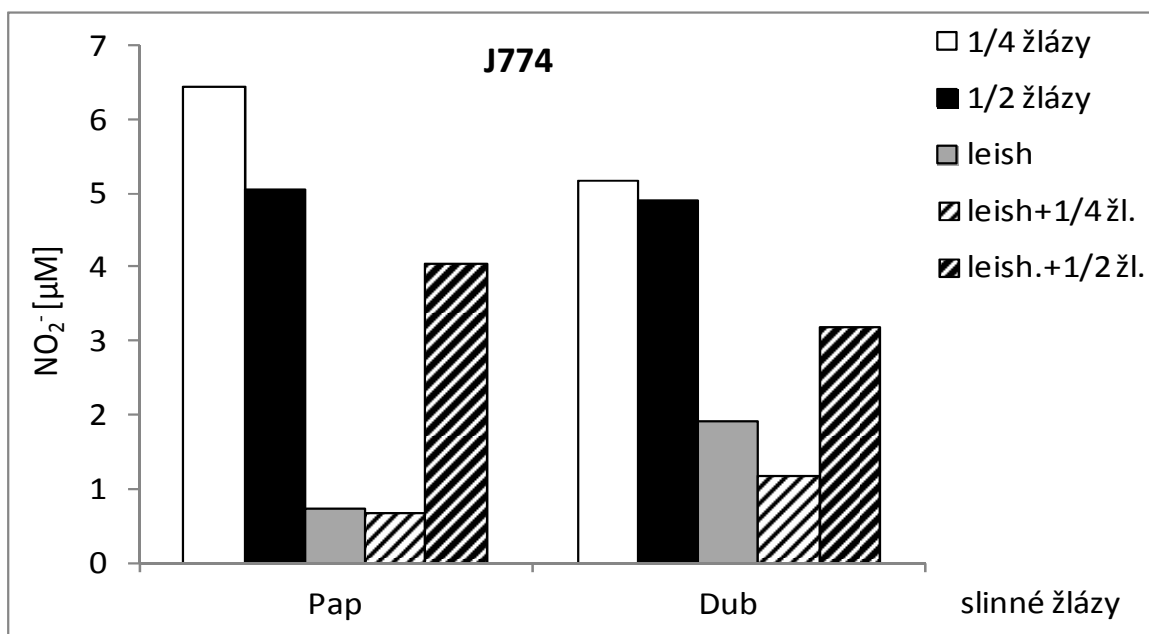
4.4 Vliv slinných žláz přenašečů *L. major* na aktivitu makrofágů

4.4.1 Produkce NO

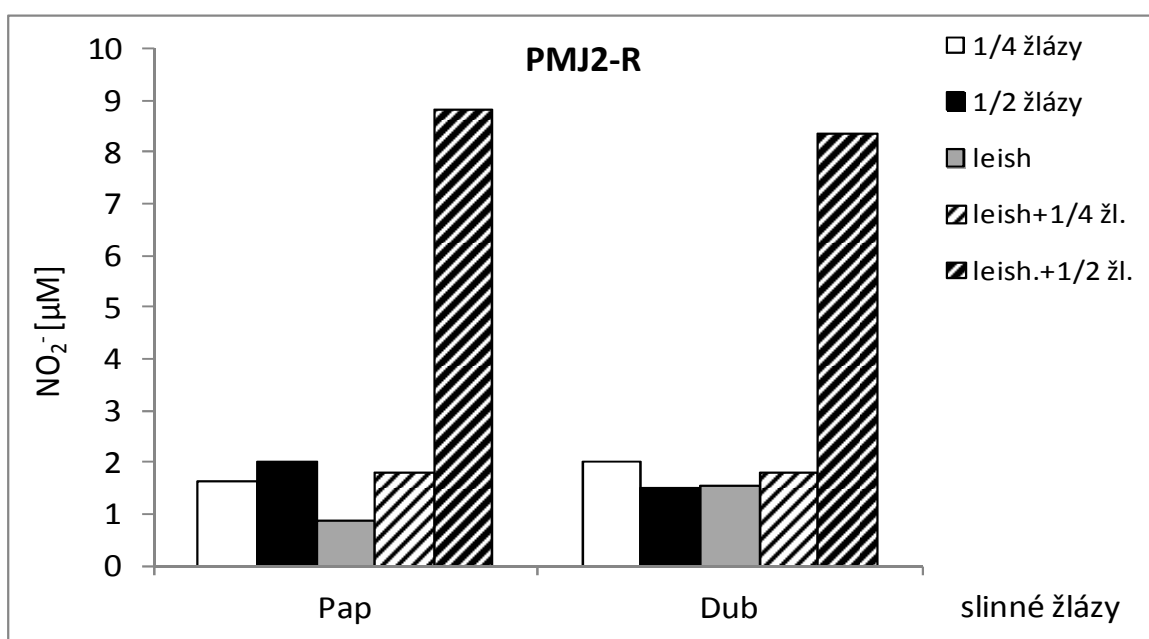
V případě obou výše zmíněných linií makrofágů byla inhibována produkce NO po použití jakékoliv výše popsané stimulace v porovnání s pozitivní kontrolou (grafy č. 12 a 13).

U J774 makrofágů byl nejvyšší stupeň inhibice v produkci NO dosažen po stimulaci samotnými promastigoty a promastigoty v kombinaci s $\frac{1}{4}$ slinné žlázy. Naproti tomu, stimulace promastigoty v kombinaci s $\frac{1}{2}$ slinné žlázy inhibiční efekt leishmanií částečně rušila.

U makrofágů PMJ2-R docházelo po přidání slinných žláz v obou koncentracích k vyššímu stupni inhibice v produkci NO v porovnání s linií J774. Po stimulaci makrofágů promastigoty *L. major* nebo po stimulaci promastigoty v kombinaci s $\frac{1}{4}$ slinné žlázy však byla produkce NO obdobná u obou linií makrofágů. U stimulace promastigoty s $\frac{1}{2}$ slinné žlázy opět platilo potlačení inhibice NO, a to ve vyšší míře než u J774 makrofágů.



Graf č. 12: Produkce NO u J774 makrofágů



Graf č. 13: Produkce NO u PMJ2-R makrofágů

V předchozích dvou grafech nejsou zahrnuty pozitivní stimulace makrofágů z důvodu grafické úpravy. V tabulce č. 3 je proto uvedeno číselné porovnání pozitivních a negativních kontrol.

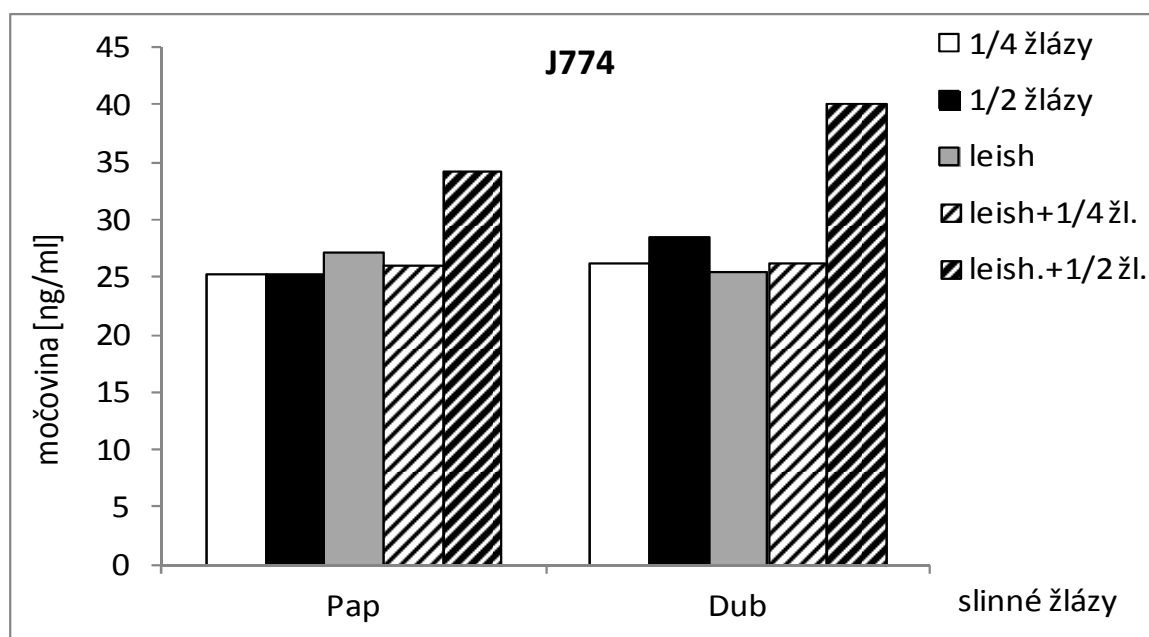
Tabulka 3: Hodnoty pozitivních a negativních kontrol u J774 a PMJ2-R makrofágů v rámci měření produkce NO, hodnoty udávají průměrnou koncentraci NO

NO [μ M]					
J774	Pap	Dub	PMJ2-R	Pap	Dub
pozitivní kontrola	19,5	16,8	pozitivní kontrola	29,9	24,4
negativní kontrola	1,6	1,2	negativní kontrola	0,8	0,9

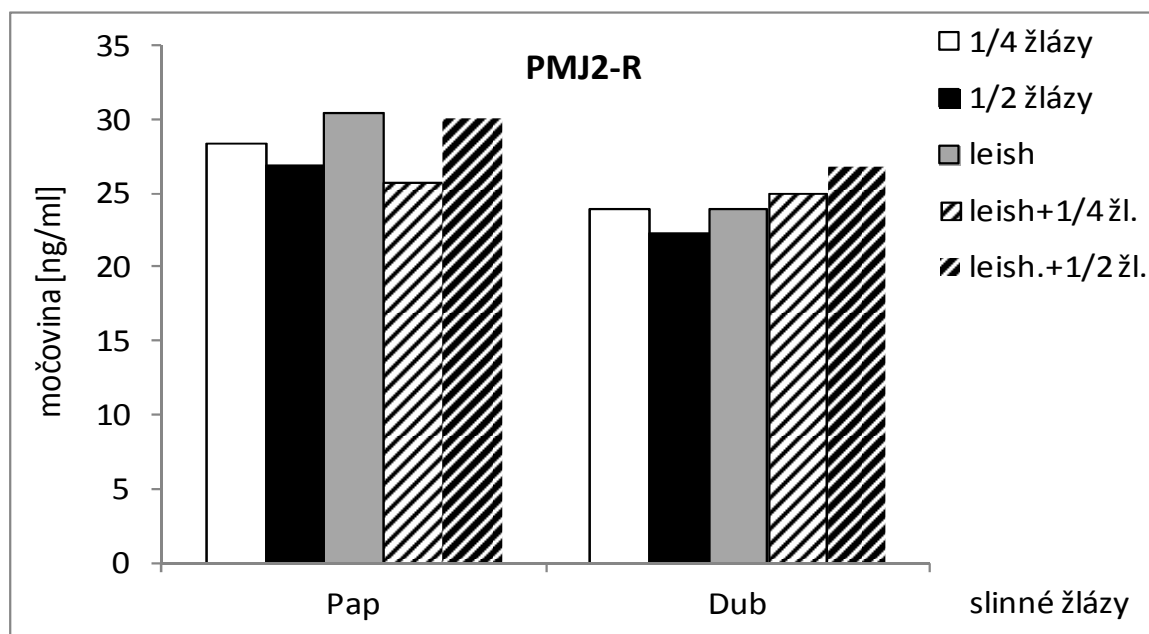
4.4.2 Produkce močoviny

U J774 makrofágů byla produkce močoviny u pozitivně a negativně stimulovaných buněk srovnatelná s produkcí u buněk stimulovaných jak slinnými žlázami, promastigoty, tak i kombinací obou těchto faktorů. Pouze při stimulaci promastigoty v kombinaci s ½ slinné žlázy byla koncentrace močoviny mírně zvýšena (graf č. 14).

U makrofágů PMJ2-R byla produkce močoviny srovnatelná mezi negativně stimulovanými makrofágy a makrofágy stimulovanými jak slinnými žlázami, promastigoty, tak i kombinací obou těchto faktorů (graf č. 15).



Graf č. 14: Produkce močoviny u J774 makrofágů



Graf č. 15: Produkce močoviny u PMJ2-R makrofágů

V předchozích dvou grafech nejsou zahrnuty pozitivní stimule makrofágů. V tabulce č. 4 je proto uvedeno číselné porovnání pozitivních a negativních kontrol.

Tabulka 4: Hodnoty pozitivních a negativních kontrol u J774 a PMJ2-R makrofágů v rámci měření produkce močoviny, hodnoty udávají průměrnou koncentraci močoviny

močovina [ng/ml]					
J774	Pap	Dub	PMJ2-R	Pap	Dub
pozitivní kontrola	32,2	28,0	pozitivní kontrola	45,9	36,9
negativní kontrola	26,5	26,8	negativní kontrola	28,3	26,8

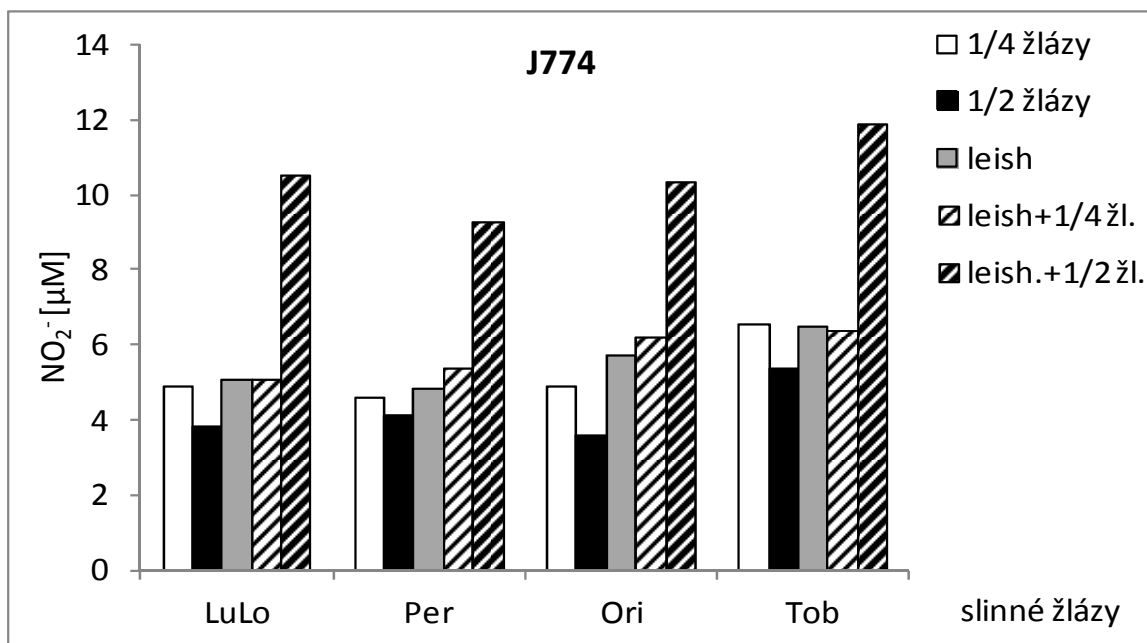
4.5 Vliv slinných žláz přenašečů *L. infantum* na aktivitu makrofágů

4.5.1 Produkce NO

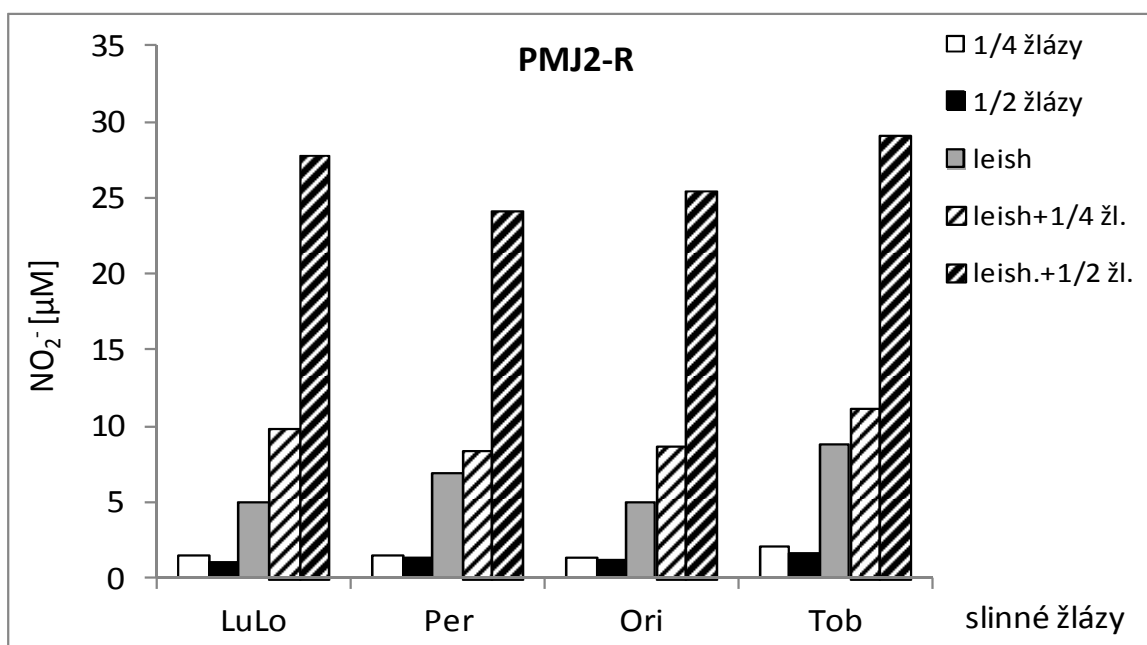
U J774 makrofágů byla inhibována produkce NO po použití jakékoliv výše popsané stimule v porovnání s pozitivní kontrolou. Nejvyšší stupeň inhibice v produkci NO byl dosažen po stimulaci 1/2 slinné žlázy. Naproti tomu, stimulace promastigoty v kombinaci s 1/2 slinné žlázy způsobovala rapidní růst koncentrace NO, stále však pod hranicí pozitivní kontroly (graf č. 16).

U makrofágů PMJ2-R docházelo po přidání slinných žláz v obou koncentracích k vyššímu stupni inhibice v produkci NO v porovnání s linií J774. Po stimulaci makrofágů promastigoty *L. infantum* nebo po stimulaci promastigoty v kombinaci s 1/4 slinné žlázy byla

produkce NO zvýšena v porovnání k vlivu samotných žláz. U stimulace promastigoty v kombinaci s ½ slinné žlázy rapidně vzrostla koncentrace NO, a to dokonce nad hranici pozitivní kontroly (graf č. 17).



Graf č. 16: Produkce NO u J774 makrofágů



Graf č. 17: Produkce NO u PMJ2-R makrofágů

V předchozích dvou grafech nejsou zahrnuty pozitivní stimulace makrofágů z důvodu grafické úpravy. V tabulce č. 5 je proto uvedeno číselné porovnání pozitivních a negativních kontrol.

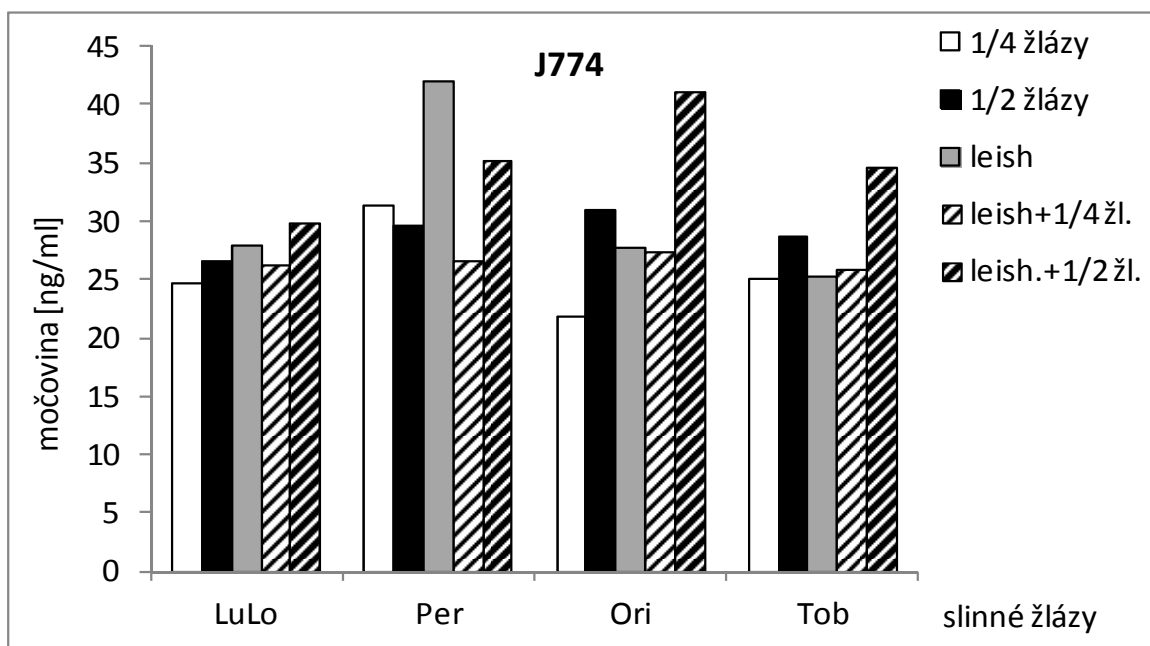
Tabulka 5: Hodnoty pozitivních a negativních kontrol u J774 a PMJ2-R makrofágů v rámci měření produkce NO, hodnoty udávají průměrnou koncentraci NO

NO [μ M]				
J774	LuLo	Per	Ori	Tob
pozitivní kontrola	16,6	17,2	16,1	19,3
negativní kontrola	1,1	1,1	1,4	1,4
PMJ2-R	LuLo	Per	Ori	Tob
pozitivní kontrola	21,3	21,7	18,9	27,9
negativní kontrola	0,4	0,5	0,4	0,7

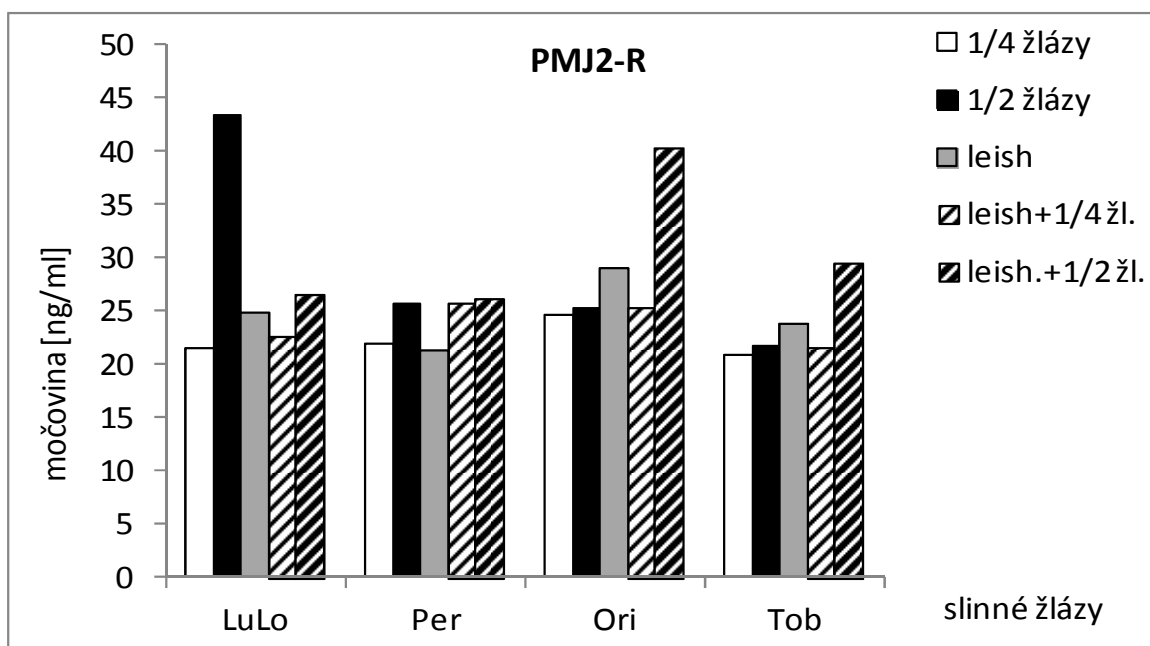
4.5.2 Produkce močoviny

U J774 makrofágů byla produkce močoviny u pozitivně a negativně stimulovaných buněk srovnatelná s produkcí u buněk stimulovaných jak slinnými žlázami, promastigoty, tak i kombinací obou těchto faktorů v případě druhů *Lu. longipalpis* a *P. tobbi*. Pouze při stimulaci promastigoty v kombinaci s ½ slinné žlázy byla koncentrace močoviny mírně zvýšena – především u druhů *P. orientalis* a *P. tobbi*. U druhu *P. perniciosus* dosahovala pozitivní a negativní kontrola vyšších hodnot v porovnání se zbylými testovanými druhy. Po stimulaci samotnými promastigoty *L. infantum* vzrostla koncentrace močoviny oproti stimulaci promastigoty v kombinaci se ¼ slinné žlázy *P. perniciosus* (graf č. 18).

U makrofágů PMJ2-R byla produkce močoviny srovnatelná mezi negativně stimulovanými makrofágy a makrofágy stimulovanými jak slinnými žlázami, promastigoty, tak i kombinací obou těchto faktorů. Pouze stimulace ½ slinné žlázy v kombinaci s promastigoty zapříčinila vzrůst produkované močoviny – především u druhů *P. orientalis* a *P. tobbi*. Pozitivně stimulované buňky u druhů *P. orientalis* a *P. tobbi* produkovaly více močoviny, v porovnání se zbylými stimulacemi a negativní kontrolou. U druhu *Lu. longipalpis* byla výrazně zvýšena produkce po stimulaci ½ slinné žlázy (graf č. 19).



Graf č. 18: Produkce močoviny u J774 makrofágů



Graf č. 19: Produkce močoviny u PMJ2-R makrofágů

V předchozích dvou grafech nejsou zahrnuty pozitivní stimulace makrofágů. V tabulce č. 4 je proto uvedeno číselné porovnání pozitivních a negativních kontrol.

Tabulka 6: Hodnoty pozitivních a negativních kontrol u J774 a PMJ2-R makrofágů v rámci měření produkce močoviny, hodnoty udávají průměrnou koncentraci močoviny

močovina [ng/ml]				
J774	LuLo	Per	Ori	Tob
pozitivní kontrola	28,1	47,6	28,6	26,1
negativní kontrola	23,7	41,0	23,2	28,0
PMJ2-R	LuLo	Per	Ori	Tob
pozitivní kontrola	29,7	27,2	31,7	37,1
negativní kontrola	24,7	26,3	22,9	20,4

5. DISKUZE

Výsledky v předložené diplomové práci poukazují na to, jaký vliv mají slinné žlázy flebotomů na imunitu myši Balb/c. Přestože se u hostitelů vystavených opakované expozici sání flebotomů vytváří jak buněčná, tak protilátková imunitní odpověď (Belkaid *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2005), experimenty této práce se zabývají především vlivem slin na buněčnou složku imunity, která je v obraně proti leishmaniové infekci klíčová (Gomes and Oliveira, 2012). Schéma experimentu bylo zvoleno za účelem prověření možnosti zkřížené protektivity mezi dvěma blízce příbuznými druhy flebotomů *P. papatasi* a *P. duboscqi*, kteří jsou zároveň významnými vektory *L. major* v přírodě. Oba výše zmíněné druhy spadají do podrodu *Phlebotomus* (Ghosh *et al.*, 1999). Areál výskytu druhu *P. papatasi* je velmi rozsáhlý, zahrnuje oblasti Mediteránu, Středního Východu a Indického subkontinentu. Výskyt *P. duboscqi* je naproti tomu situován do oblastí západní a centrální Afriky, jižně od Sahary (Lewis 1982). Sympatricky se tyto dva druhy flebotomů setkávají např. v Jemenu a Súdánu, kde jsou oba schopné přenosu *L. major* (Widaa *et al.*, 2012; WHO, březen 2010).

Nejprve je však potřeba zmínit, že naše experimenty potvrzují již dříve popsany protektivní efekt způsobený expozicí hostitele sání neinfikovaných samic flebotomů na modelu *L. major* - *P. papatasi* - Balb/c (Kamhawi *et al.*, 2000). I na našem modelu vyvolala opakovaná expozice sání flebotomů předpokládanou tvorbu imunitní reakce, která vedla k účinnější obraně hostitele proti leishmaniové infekci. Imunizovaná skupina vytvářela signifikantně menší léze, čemuž odpovídal i nižší počet leishmanií jak v infikovaném uchu, tak k němu náležící spádové uzlině.

Přestože bylo popsáno, že *L. major* má tendence u hlodavců (křečků *Mesocricetus auratus*) visceralizovat (Soliman, 2006), v našem experimentu nebyly leishmanie ve vnitřních orgánech (játra, slezina) přítomné. Nicolas *et al.* (2000) popsali na laboratorním modelu Balb/c – *L. major*, že promastigoti těchto leishmanií inokulovaní intradermálně do ucha myši Balb/c se objevili vzdáleně od místa infekce – v druhém uchu, ale také v kůži zadní části těla. Detekce leishmanií v játrech byla ale sporadická a nikdy nedosáhla více než 5000 parazitů/játra. Ve slezině byly leishmanie většinou detekovány u Balb/c myši do 3. měsíce po infekci, zatímco u geneticky rezistentních B10D2 myši byla qPCR negativní (Nicolas *et al.*, 2000). Balb/c myši použité v našich experimentech se spíše chovaly z hlediska výskytu parazitů ve vnitřních orgánech jako výše zmíněné myši rezistentní. Ovšem na visceralizaci infekce mohou mít vliv různé další faktory jako např. použitý kmen a pasáž leishmanie či stáří laboratorních myši.

Ochrana exponované skupiny dále souvisela se zvýšenou produkcí prozánětlivého cytokinu TNF- α a sníženou produkcí protizánětlivého cytokinu IL-10 v supernatantu makrofágů po stimulaci živými promastigoty *L. major*. K signifikantně nižší produkci IL-10 docházelo u imunizované skupiny také po stimulaci makrofágů promastigoty v kombinaci se slinnými žlázami *P. papatasi*. V produkci prozánětlivého cytokinu IL-12 se skupina imunizovaná od kontrolní nelišila. Dále jsme měřili aktivitu makrofágů prostřednictvím oxidu dusnatého jako produktu klasicky aktivovaných makrofágů či močoviny jako produktu alternativně aktivovaných makrofágů. Zatímco u skupiny myší s vyšší produkcí NO, jakožto molekuly toxické pro leishmanie (Green *et al.*, 1990b), by se očekávala částečná rezistence či inhibice v replikaci leishmanií, výsledky našich experimentů ukázaly opačný trend. Imunizovaná skupina, která byla chráněná vůči *L. major*, produkovala méně NO v porovnání se skupinou kontrolní. Naproti tomu produkce močoviny byla zaznamenána ve zvýšeném množství u skupiny imunizované oproti skupině kontrolní. V literatuře neexistuje srovnatelná studie popisující vliv slinných žláz na produkci oxidu dusnatého či močoviny u opakovaně pobodaných hostitelů. Pro kombinaci *P. papatasi* – *L. major* existují studie zabývající se vlivem slinných žláz na produkci NO a cytokinů pouze u naivních myší. U peritoneálních makrofágů izolovaných z geneticky rezistentních C57BL/6 a CBA/CaH-T6J myší způsobovalo přidání slinných žláz *P. papatasi* inhibici aktivace těchto makrofágů. Neschopnost přidaného IFN- γ aktivovat makrofágy v přítomnosti slin zároveň způsobovala inhibici v produkci NO (Hall and Titus, 1995). Mbow *et al.* (1998) popsali, že slinné žlázy *P. papatasi* způsobují u CBA/CaH-T6J myší změnu v produkci cytokinů v porovnání se stejným kmenem myší infikovaných samotnými *L. major*. Po aplikaci slinných žláz do myší byla detekována zvýšená exprese mRNA pro IL-4 a naopak inhibována exprese mRNA pro IFN- γ a IL-12 v lymfatické uzlině myší. Společně s inhibicí těchto prozánětlivých cytokinů byla zaznamenána inhibice exprese mRNA pro iNOS. Důležitým zjištěním bylo, že snížení exprese zmíněných cytokinů typických pro Th1 imunitní odpověď a genu pro iNOS bylo pozorováno do 28. dne po infekci, poté se rozdíl mezi skupinami myší stíraly (Mbow *et al.*, 1998). A právě zmíněný čas by mohl být důvodem, proč v našich experimentech neodpovídá množství produkovaného NO stavu rezistence či citlivosti u myší imunizovaných a naivních. Proto bychom se rádi v budoucích experimentech zaměřili na stanovení produkovaného NO, močoviny i jednotlivých cytokinů v časnější fázi infekce či přímo v místě leishmaniové léze.

Hlavním cílem naší práce bylo ověření možnosti výskytu zkřížené protekce mezi blízce příbuznými druhy *P. papatasi* a *P. duboscqi*. Již dříve bylo popsáno, že myš opakovaně exponovaná sání flebotomů *P. sergenti* specificky odpovídala na homogenát slinných žláz

tohoto druhu flebotoma prostřednictvím signifikantně zvýšené proliferace splenocytů v porovnání s proliferační rychlostí odpovídající na slinný homogenát obdrženy z jiného druhu flebotoma. Ze tří testovaných druhů flebotomů byla částečná zkřížená reakce z hlediska proliferace detekována pouze mezi blízce příbuznými druhy *P. sergenti* a *P. papatasi* (Drahota *et al.*, 2009).

Absence zkřížené reaktivity antigenů slin mezi fylogeneticky vzdálenými druhy flebotomů se odrazí i na vývoji leishmaniové infekce. Balb/c myši, které byly imunizované homogenátem slinných žláz druhů *P. papatasi*, *P. sergenti* a *Lu. longipalpis*, byly následně infikované *L. amazonensis* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis*. Pouze myši imunizované slinnými žlázami *Lu. longipalpis* byly chráněné vůči onemocnění způsobenému *L. amazonensis*. U zbylých dvou skupin došlo k rozvoji infekce spojené se zvětšující se lézí a s odpovídajícím nárůstem počtu leishmanií v infikované tkáni (Thiakaki *et al.*, 2005).

Naše myši imunizované sáním *P. papatasi*, ale infikované *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*, byly částečně chráněny proti infekci. Imunizovaná skupina vyvíjela oproti kontrolní skupině signifikantně menší léze, s čímž souvisel také nižší počet leishmanií v této tkáni a v k němu náležící spádové uzlině. Přestože statisticky průkazný rozdíl byl pouze v případě lymfatické uzliny, výsledky qPCR z infikovaného ucha se pohybovaly těsně nad hladinou signifikance. Obdobného výsledku bylo dosaženo ve studii Tavares *et al.* (2011) s druhy *Lu. longipalpis* a *Lu. intermedia*, vektory *L. braziliensis*. Zlatí křečci byli v tomto experimentu imunizováni homogenátem slinných žláz *Lu. longipalpis*. Dva týdny od poslední imunizace byli imunizované i kontrolní skupiny infikovány *L. braziliensis* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *Lu. intermedia*. Velikost léze byla redukována u skupiny imunizované v porovnání s kontrolní skupinou, čemuž odpovídal také nižší počet leishmanií v infikovaném uchu a spádové uzlině. Stejného výsledku týkajícího se kvantifikace leishmanií bylo dosaženo při imunizaci a infekci stejným druhem flebotoma (*Lu. longipalpis*). V tomto případě však nebyl detekován signifikantní rozdíl ve velikosti kožní léze mezi skupinou exponovanou a neexponovanou sání *Lu. longipalpis* (Tavares *et al.*, 2011). V našem případě se obě imunizované skupiny (P-Pap a P-Dub) nelišily v žádném parametru leishmaniové infekce; velikost léze, množství leishmanií v tkáních/orgánech i produkce protilátek proti *L. major* byla srovnatelná mezi oběma imunizovanými skupinami.

Překvapivé byly výsledky stanovující hladiny produkovaných cytokinů makrofágy, jelikož nedošlo k očekávanému zvýšení prozánětlivých cytokinů (TNF- α a IL-12) imunizované skupiny. Imunizovaná skupina produkovala méně prozánětlivých cytokinů

v porovnání s kontrolní skupinou po stimulaci makrofágů slinnými žlázami *P. duboscqi* v případě TNF- α a po stimulaci slinnými žlázami *P. papatasi* v případě IL-12. V případě protizánětlivého cytokinu IL-10 nebyl statisticky průkazný rozdíl mezi imunizovanou a kontrolní skupinou, avšak trend, kdy kontrolní skupina produkovala méně IL-10 než skupina imunizovaná, byl přítomen u všech použitých stimulací. Tyto výsledky se liší v porovnání se studií Tavares *et al.* (2011), kde byla zaznamenána signifikantní redukce v produkovaném cytokinu IL-10 u imunizované skupiny myši 3., 5. ale i 8. týden po infekci. Ve zmíněné studii však byly cytokiny stanoveny z lymfatické uzliny a navíc pomocí odlišné detekční metody měřící expresi cytokinové mRNA (Tavares *et al.*, 2011). Výsledky obou studií se mohou lišit i díky odlišnému složení slin obou rodů flebotomů (Volf *et al.*, 2000).

Stejný důvod – odlišné složení slinných žláz – může vysvětlit i rozdílný cytokinový profil, týkající se hlavně produkce IL-10, mezi oběma imunizovanými skupinami (P-Pap a P-Dub). Složení slinných žláz flebotomů se liší mezi jednotlivými druhy, a to i mezi druhy *P. papatasi* a *P. duboscqi* (Kato *et al.*, 2007; Volf *et al.*, 2000). Zatímco u druhu *P. papatasi* byla popsána přítomnost inhibitorů protein fosfatáz - AMP a adenosinu (Ribeiro *et al.*, 1999), u *P. duboscqi* tato složka slin chybí (Kato *et al.*, 2007). Naproti tomu v slinných žlázách *P. duboscqi* byla potvrzena přítomnost adenosin deaminázy (ADA) (Kato *et al.*, 2007), enzymu, který katalyzuje reakci přeměny adenosinu na inosin (Cristalli *et al.*, 2001). Tento enzym byl nalezen také u flebotomů druhu *Lu. longipalpis* (Charlab *et al.*, 2000) a dalších zástupců krevsajícího hmyzu – např. komárů *Culex quinquefasciatus* a *Aedes aegypti* (Ribeiro *et al.*, 2001). U druhu *P. papatasi* však nebyla aktivita tohoto enzymu detekována (Kato *et al.*, 2007).

Při měření aktivity makrofágů bylo dosaženo obdobných výsledků, jako je popsáno výše u skupiny imunizované i infikované flebotomy/homogenátem slin *P. papatasi*. Imunizovaná skupina (P-Dub), která byla chráněná vůči *L. major* produkovala méně NO v porovnání se skupinou kontrolní (K-Dub). Tento vztah týkající se produkce NO byl zachován mezi oběma zmíněnými skupinami u většiny použitých stimulací, s výjimkou stimulace promastigoty v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*. Zvýšená produkce močoviny byla opět zaznamenána u skupiny imunizované oproti skupině kontrolní se statisticky průkazným rozdílem u makrofágů stimulovaných homogenátem slinných žláz *P. papatasi*, kombinací těchto žláz s promastigoty *L. major*, ale také v případě negativní kontroly.

Jak bylo popsáno výše, společně s buněčnou imunitní odpovědí se u opakovaně pobodaných hostitelů utváří i protilátková imunitní odpověď proti slinám flebotomů (Belkaid

et al., 1998; Silva *et al.*, 2005), které může být využito jako expozičního ukazatele sání flebotomů (Andrade and Teixeira, 2012; Volf *et al.*, 2008). Je to především díky tomu, že hladiny protilátek korelují s délkou a intenzitou imunizace (Vlkova *et al.*, 2012) a ve většině případů nereagují zkříženě s komponenty slinných žláz z jiného druhu flebotoma (Drahota *et al.*, 2009; Rohousova *et al.*, 2005; Rohoušová *et al.*, 2012; Volf and Rohoušová, 2001). Příkladem může být studie Volf *et al.* (2001), kdy byly testovány druhy *P. papatasi*, *P. perniciosus* a *P. halepensis*. Protilátky ze sér imunizovaných zvířat vychytávaly antigeny druhově specificky, s výjimkou částečné zkřížené reakce mezi blízce příbuznými druhy *P. perniciosus* a *P. halepensis* (Volf and Rohoušová, 2001). Slabá zkřížená reakce byla zaznamenána také mezi druhy *P. sergenti* a *P. papatasi*, ale pouze v některých vzorcích, navíc v závislosti na použité detekční metodě (Drahota *et al.*, 2009; Rohousova *et al.*, 2005). Naše výsledky pak naznačují možnou zkříženou reakci i mezi anti-*P. papatasi* protilátkami a proteiny slinných žláz *P. duboscqi*, což vzhledem k blízké příbuznosti obou druhů není překvapující.

V našich experimentech vykazovaly obě imunizované skupiny myší (P-Pap i P-Dub) signifikantně vyšší titry IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* 9. týden po infekci v porovnání se skupinou kontrolní (K-Pap a K-Dub), což potvrzuje výše zmíněnou souvislost mezi množstvím produkovaných protilátek a předchozím kontaktem hostitele s vektory. Titry IgG protilátek u obou imunizovaných skupin dosahovaly až 4 krát vyšších hodnot v porovnání s množstvím protilátek dané skupiny v preimunním séru. Srovnatelné množství IgG protilátek jako u sér preimunních dosahovaly protilátky ze sér odebraných týden po imunizaci myší, což souhlasí s výsledky práce zabývající se dynamikou protilátek u opakovaně exponovaných myší, ve které Vlková *et al.* (2012) udávají, že myši imunizované sáním flebotomů *P. papatasi* vykazují signifikantní růst specifických IgG protilátek až po čtvrté či páté expozici prováděné v týdenním intervalu (Vlkova *et al.*, 2012).

Již dříve bylo popsáno, že zvýšená produkce protilátek proti slinám flebotomů souvisí s přítomností protektivní imunity proti leishmaniím (Belkaid *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2004). Gomes *et al.* (2012) popsali, že množství protilátek proti slinám *Lu. longipalpis* v séru dětí žijících v endemické oblasti viscerální leishmaniózy pozitivně koreluje s DTH odpovědí proti *L. chagasi* (Gomes *et al.*, 2002). Také v našich experimentech byla produkce IgG protilátek proti slinám *P. papatasi* i *P. duboscqi* zvýšena u skupin imunizovaných oproti skupinám kontrolním, což odpovídá výše zmíněnému potlačení rozvoje onemocnění u myší imunizovaných a plně se rozvíjející infekci *L. major* u myší kontrolních. Oproti modelu *P. duboscqi* – *L. major* jsme však nezjistili závislost mezi protilátkami proti slinám *P. papatasi* a

množstvím leishmanií v uchu (Rohoušová *et al.*, 2011), naopak jsme sledovali negativní korelaci s množstvím leishmanií v uzlině spádové infikovanému uchu. Rozdílné výsledky získané na obou myších modelech lze, mimo jiné, připsat odlišnému schématu imunizace, kdy Rohoušová *et al.* (2011) do korelační analýzy zahrnuli i dlouhodobě imunizované myši či myši s 15-ti týdenní pauzou mezi imunizací a infekcí. Svou roli může hrát i odlišné složení slinných žláz obou druhů flebotomů (Kato *et al.*, 2007).

V úvodu (kapitola 2.2) bylo zmíněno, že protilátky proti leishmaniím produkované hostitelem neposkytují ochranu proti leishmanióze, ale jsou spíše ukazatelem rozvoje infekce/akutní fáze onemocnění (Miles *et al.*, 2005; Sharma and Singh, 2009). S tímto tvrzením se shodují i naše výsledky, kdy kontrolní skupina produkovala vyšší hladiny IgG protilátek proti *L. major* v porovnání se skupinou imunizovanou, signifikantně ale pouze u skupin infikovaných v přítomnosti slin *P. papatasi*. Protilátková imunitní odpověď proti *L. major* byla srovnatelná mezi oběma imunizovanými skupinami. Celkově pak množství protilátek proti *L. major* pozitivně korelovalo jak s velikostí léze, tak s množstvím leishmanií v lézích podobně jako na modelu *L. major* – *P. duboscqi* (Rohoušová *et al.*, 2011).

Druhou částí diplomové práce byly *in vitro* pokusy, při kterých jsme testovali vliv slinných žláz vybraných druhů flebotomů, leishmanií či obou faktorů na aktivitu linií makrofágů získaných jak z kmene myši citlivých k leishmanióze (Balb/c), tak z rezistentních myši (C57BL/6). J774 monocyto-makrofágová linie je odvozena z krevních makrofágů Balb/c myši imortalizovaných nádorovými buňkami (www.sigmaaldrich.com), PMJ2-R linie makrofágů má původ v peritoneálních makrofázích C57BL/7 myši transformovaných J2 retrovirem (Adami *et al.*, 1993). Účinek slinných žláz na aktivitu těchto makrofágů byl posuzován jak u vektorů přenášejících *L. major* (*P. papatasi* a *P. duboscqi*), tak u vektorů přenášejících leishmanie z komplexu *L. donovani* (*P. perniciosus*, *Lu. longipalpis*, *P. orientalis* a *P. tobbi*).

Slinné žlázy všech šesti testovaných druhů inhibovaly produkci NO obou výše zmíněných myších linií stimulovaných kombinací IFN- γ a LPS. Těchto výsledků bylo dosaženo již dříve na linii makrofágů RAW 264.7 odvozených z Balb/c myši, na kterých byl testován účinek maxadilanu ze slin *Lu. longipalpis*. Autoři popsali, že přidání maxadilanu k buňkám stimulovaným LPS inhibuje produkci NO, se signifikantním rozdílem druhý a třetí den inkubace (Brodie *et al.*, 2007). Inkubace makrofágů se samotnými promastigoty nebo promastigoty v kombinaci s ¼ slinných žláz (přenašeči *L. major*) vedla ještě k výraznější inhibici produkce NO než inkubace se slinami flebotomů. Tato inhibice dosahovala obdobných hodnot u obou myších linií a zároveň byl stupeň inhibice tak vysoký, že hodnoty

byly srovnatelné s nestimulovanými makrofágy. Tento efekt nebyl pozorován u makrofágů inkubovaných v přítomnosti *L. infantum*. Stimulace promastigoty *L. major* v kombinaci se slinnými žlázami flebotomů v koncentraci $\frac{1}{2}$ slinné žlázy neutralizovala výše popsany inhibiční efekt samotných leishmanií či jejich kombinace s $\frac{1}{4}$ slinné žlázy. Zvýšená produkce NO po přidání promastigotů v kombinaci s $\frac{1}{2}$ slinné žlázy byla výrazná u všech testovaných kombinací makrofá-leishmanie-flebotomus; u kombinace PMJ2-R – *L. infantum* naměřené hodnoty dokonce přesáhly hladinu pozitivní kontroly, a to nezávisle na druhu flebotoma.

V rámci měření vyprodukované močoviny, produktu alternativně aktivovaných makrofágů, se ve většině případů pozitivní a negativní kontroly od sebe příliš nelišily (v porovnání rozdílu mezi pozitivní a negativní stimulací při měření NO). Domníváme se, že tento jev je podmíněn typem použité stimulace (IFN- γ a LPS), jež aktivuje makrofágy klasickou cestou. Alternativní směr aktivace je proto omezen a hodnoty produkované močoviny při této stimulaci makrofágů jsou porovnatelné s nestimulovanými buňkami. Jednotlivé stimulace množství močoviny také nijak výrazně neovlivnily. Pouze v případě J774 makrofágů byla produkce močoviny po přidání promastigotů v kombinaci s $\frac{1}{2}$ slinné žlázy mírně zvýšena (*P. papatasi*, *P. duboscqi*, *P. orientalis* a *P. tobbi*). Efekt této stimulace na množství produkované močoviny byl pozorován také u PMJ2-R makrofágů a to především u druhů *P. orientalis* a *P. tobbi*.

Jelikož experimenty na makrofágových liniích byly provedené pouze jednou, pro řádnou interpretaci získaných výsledků bude nutné tyto pokusy v budoucnu ještě zopakovat. Zároveň by bylo zajímavé sledovat produkci NO a močoviny u makrofágů stimulovaných alternativním způsobem, čehož bychom mohli docílit např. stimulací IL-4 namísto kombinace IFN- γ a bakteriálního LPS.

6. ZÁVĚREČNÉ SHRNUÍ

- Myši kmene Balb/c, které byly opakovaně vystaveny sání neinfikovaných samic *P. papatasi*, byly chráněné proti infekci *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. papatasi*.
 - U exponované skupiny se vyvinula menší léze, obsahující méně leishmanií v porovnání se skupinou naivních myší. Exponovaná skupina měla také méně leishmanií vyskytujících se ve spádové uzlině náležící infikovanému uchu a produkovala nižší hladiny protilátek proti *L. major*.
 - Ochrana imunizovaného hostitele souvisela se zvýšenou produkcí prozánětlivého cytokinu TNF- α a naopak s úbytkem protizánětlivého IL-10 produkovaného peritoneálními makrofágy; množství IL-12 zůstalo beze změny.
 - Makrofágy imunizovaných myší produkovaly méně oxidu dusnatého, zatímco arginázová aktivita byla srovnatelná s neimunizovanou kontrolní skupinou.
 - U imunizovaných myší bylo množství protilátek proti slinám *P. papatasi* signifikantně zvýšené jak oproti kontrolní skupině, tak v porovnání se vzorkem odebraným před infekcí.
- Myši kmene Balb/c, které byly opakovaně vystaveny sání neinfikovaných samic *P. papatasi*, byly chráněné proti infekci *L. major* v kombinaci s homogenátem slinných žláz *P. duboscqi*. Byla tak potvrzena částečná zkřížená protekce Balb/c myší infikovaných *L. major* mezi dvěma příbuznými druhy flebotomů *P. papatasi* a *P. duboscqi*.
 - U exponované skupiny se vyvinula menší léze, s tendencí k menšímu množství leishmanií v porovnání se skupinou naivních myší. Exponovaná skupina měla signifikantně méně leishmanií vyskytujících se ve spádové uzlině náležící infikovanému uchu. Produkce protilátek proti *L. major* byla srovnatelná s kontrolní skupinou. Produkce cytokinů u imunizovaného hostitele byla srovnatelná s kontrolní skupinou, s tendencí k zvýšené produkci protizánětlivého IL-10 a snížené produkci prozánětlivých cytokinů.

- U makrofágů imunizovaných myší byla zvýšená arginázová aktivita, zatímco produkce oxidu dusnatého byla srovnatelná s neimunizovanou kontrolní skupinou.
- U imunizovaných myší bylo množství protilátek proti slinám *P. papatasi* signifikantně zvýšené jak oproti kontrolní skupině, tak v porovnání se vzorkem odebraným před infekcí. Protilátky proti slinám *P. duboscqi* byly srovnatelné s neimunizovanou kontrolou, avšak signifikantně zvýšené oproti stavu před infekcí.
- Imunizovaná skupina infikovaná v přítomnosti homogenátu slinných žláz *P. duboscqi* (P-Dub) se nelišila od imunizované skupiny infikované v přítomnosti homogenátu slinných žláz *P. papatasi* ani v jednom z následujících parametrů: velikost leishmaniové léze, množství parazitů v infikovaném uchu a k němu příslušící spádové uzlině, množství protilátek proti *L. major* či slinám *P. papatasi* a *P. duboscqi*, v produkci močoviny, TNF- α a IL-12. Makrofágy skupiny P-Dub však produkovaly více NO po stimulaci slinami *P. papatasi* a více IL-10 po stimulaci slinami *P. papatasi* v kombinaci s promastigoty *L. major*.
- U klasicky stimulovaných linií makrofágů byla po přidání slinných žláz vybraných druhů flebotomů, promastigotů *L. major* i *L. infantum*, ale také po přidání obou zmíněných faktorů inhibována produkce NO. Naproti tomu, alternativní cesta aktivace stanovená prostřednictvím produkované močoviny nebyla přidávanými stimulanty výrazně ovlivněna.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Adami, C., Brunda, M.J., and Palleroni, A.V. (1993). In vivo immortalization of murine peritoneal macrophages: a new rapid and efficient method for obtaining macrophage cell lines. *J Leukoc Biol* 53, 475-478.

Aga, E., Katschinski, D.M., van Zandbergen, G., Laufs, H., Hansen, B., Muller, K., Solbach, W., and Laskay, T. (2002). Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 169, 898-905.

Andrade, B.B., and Teixeira, C.R. (2012). Biomarkers for exposure to sand flies bites as tools to aid control of leishmaniasis. *Front Immunol* 3, 121.

Antinori, S., Schifanella, L., and Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31, 109-118.

Balana-Fouce, R., Calvo-Alvarez, E., Alvarez-Velilla, R., Prada, C.F., Perez-Pertejo, Y., and Reguera, R.M. (2012). Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 181, 85-93.

Barralnetto, M., Barral, A., Brownell, C.E., Skeiky, Y.A.W., Ellingsworth, L.R., Twardzik, D.R., and Reed, S.G. (1992). Transforming growth-factor-beta in leishmanial infection - a parasite escape mechanism. *Science* 257, 545-548.

Beil, W.J., Meinardusager, G., Neugebauer, D.C., and Sorg, C. (1992). Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Journal of Leukocyte Biology* 52, 135-142.

Belkaid, Y., Kamhawi, S., Modi, G., Valenzuela, J., Noben-Trauth, N., Rowton, E., Ribeiro, J., and Sacks, D.L. (1998). Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: Powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *Journal of Experimental Medicine* 188, 1941-1953.

Belosevic, M., Finbloom, D.S., Vandermeide, P.H., Slayter, M.V., and Nacy, C.A. (1989). Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural-resistance of C3H-HEN mice to infection with *Leishmania-major*. *Journal of Immunology* 143, 266-274.

- Brittingham, A., Morrison, C.J., McMaster, W.R., McGwire, B.S., Chang, K.P., and Mosser, D.M. (1995). Role of the leishmania surface protease GP63 in complement-fixation, cell-adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *Journal of Immunology* 155, 3102-3111.
- Brodie, T.M., Smith, M.C., Morris, R.V., and Titus, R.G. (2007). Immunomodulatory effects of the *Lutzomyia longipalpis* salivary gland protein maxadilan on mouse macrophages. *Infection and Immunity* 75, 2359-2365.
- Charlab, R., Rowton, E.D., and Ribeiro, J.M. (2000). The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Exp Parasitol* 95, 45-53.
- Claborn, D.M. (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. *J Glob Infect Dis* 2, 127-134.
- Corraliza, I.M., Soler, G., Eichmann, K., and Modolell, M. (1995). Arginase induction by suppressors of nitric-oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE(2)) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 206, 667-673.
- Costa, D.J., Favali, C., Clarencio, J., Afonso, L., Conceicao, V., Miranda, J.C., Titus, R.G., Valenzuela, J., Barral-Netto, M., Barral, A., et al. (2004). *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infection and Immunity* 72, 1298-1305.
- Cristalli, G., Costanzi, S., Lambertucci, C., Lupidi, G., Vittori, S., Volpini, R., and Camaioni, E. (2001). Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. *Med Res Rev* 21, 105-128.
- da Matta, V.L., Hoshino-Shimizu, S., Dietze, R., and Corbett, C.E. (2000). Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. *J Clin Lab Anal* 14, 5-12.
- da Silva, R.A., Tavares, N.M., Costa, D., Pitombo, M., Barbosa, L., Fukutani, K., Miranda, J.C., de Oliveira, C.I., Valenzuela, J.G., Barral, A., et al. (2011). DNA vaccination with KMP11 and *Lutzomyia longipalpis* salivary protein protects hamsters against visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 120, 185-190.
- da Silva, R.P., Hall, B.F., Joiner, K.A., and Sacks, D.L. (1988). CR1 mediates binding of *L. major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 Suppl 1, 459-463.

- Da Silva, R.P., Hall, B.F., Joiner, K.A., and Sacks, D.L. (1989). CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol* 143, 617-622.
- de Moura, T.R., Oliveira, F., Novais, F.O., Miranda, J.C., Clarêncio, J., Follador, I., Carvalho, E.M., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., Barral, A., et al. (2007). Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. *PLoS Negl Trop Dis* 1, e84.
- Desjardins, M., and Descoteaux, A. (1997). Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Journal of Experimental Medicine* 185, 2061-2068.
- Dong, Z.Y., Yang, X.L., Xie, K.P., Juang, S.H., Llansa, N., and Fidler, I.J. (1995). Activation of inducible nitric oxide synthase gene in murine macrophages requires protein phosphatases 1 and 2A activities. *Journal of Leukocyte Biology* 58, 725-732.
- Drahota, J., Lipoldová, M., Volf, P., and Rohousová, I. (2009). Specificity of anti-saliva immune response in mice repeatedly bitten by *Phlebotomus sergenti*. *Parasite Immunol* 31, 766-770.
- Drapier, J.C., Wietzerbin, J., and Hibbs, J.B. (1988). Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cyto-toxic effector mechanism in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 18, 1587-1592.
- Ghosh, K.N., Mukhopadhyay, J.M., Guzman, H., Tesh, R.B., and Munstermann, L.E. (1999). Interspecific hybridization and genetic variability of *Phlebotomus* sandflies. *Med Vet Entomol* 13, 78-88.
- Gomes, R., and Oliveira, F. (2012). The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on leishmania immunity. *Front Immunol* 3, 110.
- Gomes, R., Teixeira, C., Teixeira, M.J., Oliveira, F., Menezes, M.J., Silva, C., de Oliveira, C.I., Miranda, J.C., Elnaïem, D.E., Kamhawi, S., et al. (2008). Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7845-7850.
- Gomes, R.B., Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Costa, J., Miranda, J.C., Caldas, A., Valenzuela, J.G., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2002). Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* saliva concurrent with the development of anti-*Leishmania chagasi* delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis* 186, 1530-1534.

Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S., and Nacy, C.A. (1990a). Leishmania-major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor-necrosis-factor-alpha. *Journal of Immunology* 145, 4290-4297.

Green, S.J., Meltzer, M.S., Hibbs, J.B., and Nacy, C.A. (1990b). Activated macrophages destroy intracellular Leishmania-major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology* 144, 278-283.

Hall, L.R., and Titus, R.G. (1995). Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania-major and nitric-oxide production. *Journal of Immunology* 155, 3501-3506.

Heinzel, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E., and Gately, M.K. (1993). Recombinant interleukin-12 cures mice infected with Leishmania-major. *Journal of Experimental Medicine* 177, 1505-1509.

Iniesta, V., Gomez-Nieto, L.C., and Corraliza, I. (2001). The inhibition of arginase by N-omega-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. *Journal of Experimental Medicine* 193, 777-783.

Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., and Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science* 290, 1351-1354.

Kato, H., Jochim, R.C., Lawyer, P.G., and Valenzuela, J.G. (2007). Identification and characterization of a salivary adenosine deaminase from the sand fly *Phlebotomus duboscqi*, the vector of *Leishmania major* in sub-Saharan Africa. *J Exp Biol* 210, 733-740.

Katz, O., Waitumbi, J.N., Zer, R., and Warburg, A. (2000). Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62, 145-150.

Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., and McMahon-Pratt, D. (2000). Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Journal of Experimental Medicine* 191, 1063-1067.

Klein J, Horejsi V (1997) *Immunology*, Second edition

Kopf, M., Brombacher, F., Kohler, G., Kienzle, G., Widmann, K.H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B., and Solbach, W. (1996). IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *Journal of Experimental Medicine* 184, 1127-1136.

- Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology* 11, 210-214.
- Lerner, E.A., Ribeiro, J.M.C., Nelson, R.J., and Lerner, M.R. (1991). Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary-glands of the sand fly *Lutzomyia-longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 11234-11236.
- Lewis, D.J. (1982). A taxonomic review of the genus *Phlebotomus* (Diptera: Psychodidae). *Bul. Mus. Nat. His. (Ent. Ser.)* 45:121-209
- Liew, F.Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R.M.J., and Moncada, S. (1990). Macrophage killing of leishmania parasite in vivo is mediated by nitric-oxide from L-arginine. *Journal of Immunology* 144, 4794-4797.
- Lima, H.C., and Titus, R.G. (1996). Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. *Infection and Immunity* 64, 5442-5445.
- Maia, C., Nunes, M., Cristóvão, J., and Campino, L. (2010). Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta Trop* 116, 193-199.
- Maia, C., Seblova, V., Sadlova, J., Votypka, J., and Volf, P. (2011). Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1181.
- Mbow, M.L., Bleyenbergh, J.A., Hall, L.R., and Titus, R.G. (1998). *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 161, 5571-5577.
- McConville, M.J., and Blackwell, J.M. (1991). Developmental-changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani* - characterization of the promastigote and amastigote glycolipids. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15170-15179.
- McConville, M.J., Turco, S.J., Ferguson, M.A.J., and Sacks, D.L. (1992). Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania-major* promastigotes to an infectious stage. *Embo Journal* 11, 3593-3600.
- Miles, S.A., Conrad, S.M., Aves, R.G., Jeronimo, S.M.B., and Mosser, D.M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *Journal of Experimental Medicine* 201, 747-754.

- Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., and Baneth, G. (2008). Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol* 24, 371-377.
- Moore, K.J., and Matlashewski, G. (1994). Intracellular infection by *Leishmania-donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology* 152, 2930-2937.
- Morris, R.V., Shoemaker, C.B., David, J.R., Lanzaro, G.C., and Titus, R.G. (2001). Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against L-major infection. *Journal of Immunology* 167, 5226-5230.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). 2 types of murine helper T-cell clone .1. definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136, 2348-2357.
- Mosmann, T.R., and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17, 138-146.
- Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* 73, 209-212.
- Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8, 958-969.
- Munder, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (1998). Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase arginase balance: Competitive regulation by CD4(+) T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *Journal of Immunology* 160, 5347-5354.
- Murray, H.W. (1982). Cell-mediated immune-response in experimental visceral leishmaniasis .2. oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania-donovani* amastigotes. *Journal of Immunology* 129, 351-357.
- Murray, H.W., and Nathan, C.F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: Reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine* 189, 741-746.
- Murray, H.W., Rubin, B.Y., and Rothermel, C.D. (1983). Killing of intracellular *Leishmania-donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes - evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *Journal of Clinical Investigation* 72, 1506-1510.

- Myskova, J., Votypka, J., and Volf, P. (2008). Leishmania in sand flies: Comparison of quantitative polymerase chain reaction with other techniques to determine the intensity of infection. *Journal of Medical Entomology* 45, 133-138.
- Nicolas, L., Sidjanski, S., Colle, J.H., and Milon, G. (2000). Leishmania major reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. *Infect Immun* 68, 6561-6566.
- Oliveira, F., Lawyer, P.G., Kamhawi, S., and Valenzuela, J.G. (2008). Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-Leishmania Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. *Plos Neglected Tropical Diseases* 2.
- Pavli, A., and Maltezou, H.C. (2010). Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. *International Journal of Infectious Diseases* 14, E1032-E1039.
- Peters, N.C., Egen, J.G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M.P., Germain, R.N., and Sacks, D. (2008). In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321, 970-974.
- Pimenta, P.F.P., Saraiva, E.M.B., and Sacks, D.L. (1991). The comparative fine-structure and surface glycoconjugate expression of 3 life stages of Leishmania-major. *Experimental Parasitology* 72, 191-204.
- Proudfoot, L., Nikolaev, A.V., Feng, G.J., Wei, X.Q., Ferguson, M.A.J., Brimacombe, J.S., and Liew, F.Y. (1996). Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 10984-10989.
- Proudfoot, L., Odonnell, C.A., and Liew, F.Y. (1995). Glycoinositolphospholipids of Leishmania-major inhibit nitric-oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 25, 745-750.
- Puentes, S.M., Dasilva, R.P., Sacks, D.L., Hammer, C.H., and Joiner, K.A. (1990). Serum resistance of metacyclic stage Leishmania-major promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology* 145, 4311-4316.
- Puentes, S.M., Dwyer, D.M., Bates, P.A., and Joiner, K.A. (1989). Binding and release of C-3 from Leishmania-donovani promastigotes during incubation in normal human-serum. *Journal of Immunology* 143, 3743-3749.

- Ribeiro, J.M., Mans, B.J., and Arcà, B. (2010). An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. *Insect Biochem Mol Biol* 40, 767-784.
- Ribeiro, J.M., Charlab, R., and Valenzuela, J.G. (2001). The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*. *J Exp Biol* 204, 2001-2010.
- Ribeiro, J.M.C. (1987). Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annual Review of Entomology* 32, 463-478.
- Ribeiro, J.M.C., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., and Warburg, A. (1999). Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *Journal of Experimental Biology* 202, 1551-1559.
- Rogers, M., Kropf, P., Choi, B.S., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P., and Muller, I. (2009). Proteophosphoglycans Regurgitated by Leishmania-Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. *Plos Pathogens* 5.
- Rogers, M.E. (2012). The Role of Leishmania Proteophosphoglycans in Sand Fly Transmission and Infection of the Mammalian Host. *Front Microbiol* 3, 223.
- Rogers, M.E., and Bates, P.A. (2007). Leishmania manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *Plos Pathogens* 3, 818-825.
- Rogers, M.E., Chance, M.L., and Bates, P.A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124, 495-507.
- Rogers, M.E., Ilg, T., Nikolaev, A.V., Ferguson, M.A.J., and Bates, P.A. (2004). Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature* 430, 463-467.
- Rohousova, I., Ozensoy, S., Ozbel, Y., and Volf, P. (2005). Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology* 130, 493-499.
- Rohousova, I., and Volf, P. (2006). Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. *Folia Parasitologica* 53, 161-171.
- Rohoušová, I., Hostomská, J., Vlková, M., Kobets, T., Lipoldová, M., and Volf, P. (2011). The protective effect against *Leishmania* infection conferred by sand fly bites is limited to short-term exposure. *Int J Parasitol* 41, 481-485.

- Rohoušová, I., Volfová, V., Nová, S., and Volf, P. (2012). Individual variability of salivary gland proteins in three *Phlebotomus* species. *Acta Trop* 122, 80-86.
- Sadick, M.D., Heinzel, F.P., Holaday, B.J., Pu, R.T., Dawkins, R.S., and Locksley, R.M. (1990). Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin-4 monoclonal-antibody - evidence for a T-cell dependent, interferon-gamma independent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 171, 115-127.
- Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., and Titus, R. (1991). A mouse model of *Leishmania-braziliensis-braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. *Journal of Experimental Medicine* 173, 49-54.
- Scharton, T.M., and Scott, P. (1993). Natural-killer-cells are a source of interferon-gamma that drives differentiation of CD4+ T-cell subsets and induces early resistance to *Leishmania-major* in mice. *Journal of Experimental Medicine* 178, 567-577.
- Schebesch, C., Kodelja, V., Muller, C., Hakij, N., Bisson, S., Orfanos, C.E., and Goerdts, S. (1997). Alternatively activated macrophages actively inhibit proliferation of peripheral blood lymphocytes and CD4(+) T cells in vitro. *Immunology* 92, 478-486.
- Schlein, Y., Jacobson, R.L., and Messer, G. (1992). *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9944-9948.
- Schneider, P., Rosat, J.P., Bouvier, J., Louis, J., and Bordier, C. (1992). *Leishmania-major* - differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. *Experimental Parasitology* 75, 196-206.
- Schönian, G., Kuhls, K., and Mauricio, I.L. (2011). Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138, 405-425.
- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., and Sher, A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis - T-cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T-helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine* 168, 1675-1684.
- Sharma, U., and Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45, 255-272.
- Sharma, U., and Singh, S. (2009). Immunobiology of leishmaniasis. *Indian Journal of Experimental Biology* 47, 412-423.

Sigma-Aldrich - <http://www.sigmaaldrich.com>

Silva, F., Gomes, R., Prates, D., Miranda, J.C., Andrade, B., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2005). Inflammatory cell infiltration and high antibody production in BALB/c mice caused by natural exposure to *Lutzomyia longipalpis* bites. *Am J Trop Med Hyg* 72, 94-98.

Soliman, M.F. (2006). The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Trop* 97, 146-150.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin-4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity - a marker of alternative immunological macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* 176, 287-292.

Stierhof, Y.D., Bates, P.A., Jacobson, R.L., Rogers, M.E., Schlein, Y., Handman, E., and Ilg, T. (1999). Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *European Journal of Cell Biology* 78, 675-689.

Sypek, J.P., Chung, C.L., Mayor, S.E.H., Subramanyam, J.M., Goldman, S.J., Sieburth, D.S., Wolf, S.F., and Schaub, R.G. (1993). Resolution of cutaneous leishmaniasis - interleukin-12 initiates a protective T-helper type-1 immune-response. *Journal of Experimental Medicine* 177, 1797-1802.

Tavares, N.M., Silva, R.A., Costa, D.J., Pitombo, M.A., Fukutani, K.F., Miranda, J.C., Valenzuela, J.G., Barral, A., de Oliveira, C.I., Barral-Netto, M., et al. (2011). *Lutzomyia longipalpis* saliva or salivary protein LJM19 protects against *Leishmania braziliensis* and the saliva of its vector, *Lutzomyia intermedia*. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1169.

Theodos, C.M., Ribeiro, J.M.C., and Titus, R.G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on leishmania infection in mice. *Infection and Immunity* 59, 1592-1598.

Thiakaki, M., Rohousova, I., Volfova, V., Volf, P., Chang, K.P., and Soteriadou, K. (2005). Sand fly specificity of saliva-mediated protective immunity in *Leishmania amazonensis*-BALB/c mouse model. *Microbes Infect* 7, 760-766.

Titus, R.G., and Ribeiro, J.M.C. (1988). Salivary-gland lysates from the sand fly *Lutzomyia-longipalpis* enhance leishmania infectivity. *Science* 239, 1306-1308.

Valenzuela, J.G., Belkaid, Y., Garfield, M.K., Mendez, S., Kamhawi, S., Rowton, E.D., Sacks, D.L., and Ribeiro, J.M.C. (2001). Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein. *Journal of Experimental Medicine* 194, 331-342.

- Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R.A.I., Maes, L., and Cos, P. (2011). Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 337-351.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004). Cutting edge: Neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. *Journal of Immunology* 173, 6521-6525.
- Vanloubbeeck, Y.F., Ramer, A.E., Jie, F., and Jones, D.E. (2004). CD4(+) Th1 cells induced by dendritic cell-based immunotherapy in mice chronically infected with *Leishmania amazonensis* do not promote healing. *Infection and Immunity* 72, 4455-4463.
- Vlkova, M., Rohousova, I., Hostomska, J., Pohankova, L., Zidkova, L., Drahota, J., Valenzuela, J.G., and Volf, P. (2012). Kinetics of Antibody Response in BALB/c and C57BL/6 Mice Bitten by *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1719.
- Volf, P., Hajmova, M., Sadlova, J., and Votypka, J. (2004). Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. *International Journal for Parasitology* 34, 1221-1227.
- Volf, P., Hostomska, J., and Rohousova, I. (2008). Molecular crosstalks in Leishmania-sandfly-host relationships. *Parasite* 15, 237-243.
- Volf, P., and Rohousová, I. (2001). Species-specific antigens in salivary glands of phlebotomine sandflies. *Parasitology* 122 Pt 1, 37-41.
- Volf, P., Tesarova, P., and Nohynkova, E. (2000). Salivary proteins and glycoproteins in phlebotomine sandflies of various species, sex and age. *Medical and Veterinary Entomology* 14, 251-256.
- Volf, P., and Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *Journal of Vector Ecology* 36, S1-S9.
- Waitumbi, J., and Warburg, A. (1998). *Phlebotomus papatasi* saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infection and Immunity* 66, 1534-1537.
- Wang, Z.E., Reiner, S.L., Zheng, S.C., Dalton, D.K., and Locksley, R.M. (1994). CD4+ effector-cells default to the TH2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania-major*. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1367-1371.

Warburg, A., Saraiva, E., Lanzaro, G.C., Titus, R.G., and Neva, F. (1994). Saliva of *Lutzomyia longipalpis* sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 345, 223-230.

Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, C.J., Huang, F.P., Xu, D.M., Muller, W., Moncada, S., and Liew, F.Y. (1995). Altered immune-responses in mice lacking inducible nitric-oxide synthase. *Nature* 375, 408-411.

WHO (2010) http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf

WHO - <http://www.who.int/en/>

Widaa, S.O., Ahmed, K.A., Bari, A.A., Ali, M.M., Ibrahim, M.A., Bashir, M.A., Mastour, A.H., Yagi, Z.A., and Hassan, M.M. (2012). Sandflies (Diptera: Psychodidae) in a focus of visceral leishmaniasis in White Nile, Sudan. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 470-475.

Wilhelm, P., Ritter, U., Labbow, S., Donhauser, N., Rollinghoff, M., Bogdan, C., and Korner, H. (2001). Rapidly fatal Leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. *Journal of Immunology* 166, 4012-4019.

Xu, X., Oliveira, F., Chang, B.W., Collin, N., Gomes, R., Teixeira, C., Reynoso, D., My Pham, V., Elnaïem, D.E., Kamhawi, S., et al. (2011). Structure and function of a "yellow" protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. *J Biol Chem* 286, 32383-32393.